

تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن F سویه واکسینال Clone IR 12 ویروس نیوکاسل موسسه رازی

• ایوب سلیمی

دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس شناسی موسسه رازی

• آیدین ملوکی (نویسنده مسئول)

عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• حسین گودرزی

عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

• سیدرضا ابراهیمی

عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۷-۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۹-۱۳



Email: a.molouki@rvsri.ac.ir

چکیده

ویروس نیوکاسل یکی از مهم‌ترین ویروس‌های صنعت طیور می‌باشد. این ویروس با توجه به حدت سویه‌های مختلف، علائم کلینیکی و تلفات متفاوتی دارد. پروتئین فیوژن یکی از پروتئین‌های مهم این ویروس، نقش مهمی در تعیین حدت ویروس دارد. در این مطالعه توالی ژنومی این پروتئین تعیین توالی گردیده است. بدین منظور واکسن کلون IR. 12، که از سویه ویروس لاسوتا به روش پلاک اسی در موسسه رازی تهیه شده بود، انتخاب گردید. ابتدا ویروس با رقت مناسب به حفره آلانتوئیک تخم مرغ SPF دارای جنین ده روزه تزریق شد. و پس از طی زمان مناسب برای رشد ویروس، مایع آلانتوئیک آن جمع‌آوری شد. ویروس با استفاده از سانتریفوژ دور بالا و گرادیانته ساکارز به صورت مناسب تخلیص شد. RNA ویروس استخراج، و قطعه cDNA از روی ژنوم ساخته شد. پرایمرهای مناسب طراحی شد و PCR انجام گرفت. محصول استخراج گردید. محصول استخراج در پلاسمید مناسب کلون شد. محصول کلون شده به باکتری ترانسفورم شد. باکتری حاوی پلاسمید در دمای مناسب تکثیر پیدا کرد. پلاسمید به روش Sambrook استخراج گردید. برای اطمینان از کلونینگ موفق آنزیم برشی BglIII استفاده شد. پس از این مرحله پلاسمید برای تعیین توالی به روش سانگر آماده شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار مگا ۵ توالی ژنومی تحلیل و هم‌ردیف سازی انجام گرفت. در نتیجه این مطالعه توالی ژن F به صورت کامل تعیین توالی، و با سویه‌های لنتوژنیک موجود در بانک ژن مقایسه و بررسی شد. در نتیجه آن توالی ژنومی در این مطالعه با برخی توالی‌های بانک ژن به طور کامل هم‌ردیف هستند و با برخی توالی‌های دیگر در برخی نوکلئوتیدها متفاوت می‌باشد.

کلمات کلیدی: نیوکاسل، سویه کلون، پلاسمید، تعیین توالی، ژنوم

- Veterinary Researches & Biological Products No 124 pp: 9-18

Sequencing of the F gene of Razi Institute's vaccinal NDV strain Clone IR 12

By: Salimi A., Department of Poultry Research and Vaccine Production. Molouki A., Department of Avian Disease Research and Diagnostic, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz 3197619751, Iran. Goodarzi H., Department of Avian Disease Research and Diagnostic, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz 3197619751, Iran and Ebrahimi S.R., Department of Poultry Research and Vaccine Production.

Received: 2018-10-13 Accepted: 2018-12-04

Email: a.molouki@rvsri.ac.ir

Newcastle disease virus is an important virus in poultry industry. Use of killed or attenuated vaccine against the disease elevates immunological protection. The F gene is a major determinant in virulence of the virus. Therefore, in this study we aimed to sequence the F gene of Razi LaSota-derived and plaque-purified NDV strain IR12 and analyze it. The virus was inoculated into 10-day-old SPF embryonated chicken eggs and then the allantoic fluid was subjected to sucrose gradient purification using ultra centrifuge. The purified virus band was then subjected to RNA extraction and cDNA synthesis using gene specific primers. PCR was run using specific primers to amplify the F gene and then the band was gel extracted and cloned to pJet1.2 plasmids in a 3 to 1 ratio and transformed to a suitable competent cell. The extracted plasmid was then digested with BglII restriction enzyme to confirm the presence of the insert and then the plasmid was Sanger sequenced. As a result, the gene sequence F was completely sequenced and compared with the lentogenic strains found in the gene bank. The sequence was then assembled using MEGA6, the cleavage-site sequence of 112G-R-Q-G-R-L117 was obtained and then the phylogenetic tree was drawn. As a result, the gene sequence F was completely sequenced and compared with the lentogenic strains found in the gene bank.

Key words: Newcastle disease virus, LaSota strain, Cloning, Sequencing

علائم و شدت پاتولوژی به چهار سویه تقسیم می‌شود. سویه ولوژنیک با علائم شدید، شامل علائم عصبی و گوارشی می‌باشد که تلفات آن تا ۱۰۰٪ هم می‌رسد. سویه‌های مزوژنیک که علائم بیماری آن که بیشتر گوارشی می‌باشد و تلفات آن تا ۵۰٪ می‌باشد. سویه‌های لنتوژنیک علائم بسیار خفیفی ایجاد می‌کنند. اکثر سویه‌های واکسینال از این سویه‌های لنتوژنیک انتخاب می‌شوند. در نهایت سویه‌های بدون علامت که بعضاً علائم بیماری آن‌ها تشخیص داده نمی‌شوند (۱۰).

این ویروس دارای RNA تک‌رشته‌ای با سنس منفی، دارای کپسید ۲۰ وجهی، همچنین دارای پوشش می‌باشد. ویروس دارای شش پروتئین اصلی به ترتیب ژنی نوکلئو پروتئین، پروتئین P، ماتریکس (M)، فیوژن (F)، هم‌گلوپتین نورآمینیداز (HN) و پروتئین L می‌باشد. علاوه بر این پروتئین‌ها، دو پروتئین V و W از ویرایش RNA ژنوم P ایجاد می‌شوند (۱۳). اساس بیماری‌زایی ویروس عامل بیماری نیوکاسل، شکست پروتئولیکی پیش ساز پروتئین سطحی F(F0) به دو زیر واحد F1 و F2 می‌باشد. این زیر واحدها توسط اتصال‌های دی سولفیدی بهم وصل می‌باشند. این شکست پروتئینی در منطقه‌ای بنام منطقه شکست (Cleavage site) رخ می‌دهد که بین جایگاه‌های ۱۱۲ تا ۱۱۷ اسید آمینوای

مقدمه

بیماری نیوکاسل طیور از مهم‌ترین بیماری‌های صنعت طیور می‌باشد که سالانه هزینه اقتصادی زیادی را بر این صنعت تحمیل می‌کند. ویروس عامل این بیماری می‌توانند طیف گسترده‌ای از پرندگان را آلوده کنند (۲). این ویروس علاوه بر ماکیان، بوقلمون، بلدرچین، گنجشک، طوطی و حتی پرندگان منحصرأ گوشتخوار را نیز آلوده می‌کند. ویروس بیماری نیوکاسل در گستره بسیار وسیعی از گونه‌های غیر طیوری رشد و تکثیر می‌نماید و حتی در برخی موارد باعث عفونت و گزارش موردی در انسان شده است که ورم ملتحمه ایجاد می‌کند. با تمام این موارد بهترین و پر کاربردترین گونه برای تکثیر عامل بیماری جوجه ماکیان می‌باشد که یکی از مهم‌ترین میزبانان طبیعی برای ویروس بیماری نیوکاسل است (۱، ۱۰). این بیماری بعضاً تا تلفات صد در صدی را ایجاد می‌کند و یکی از راه‌های کاهش تلفات واکسیناسیون گله جوجه‌ها می‌باشد. امروزه واکسن‌های زنده و کشته این بیماری ویروسی در دسترس می‌باشد (۷). ویروس این بیماری جزء خانواده پارامیکسو ویروس‌ها و جنس آوولو ویروس و به طور دقیق آوولو ویروس تیپ یک می‌باشد. سویه‌های این ویروس بر اساس

گرادیانت ساکارز

ابتدا رقت‌های مختلفی از ساکارز به صورت ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ درصد به همراه آب مقطر تهیه شد. رقت‌ها به آرامی و به ترتیب از رقت غلیظ‌تر به رقت رقیق‌تر در لوله مخصوص گرادیانت سانتیفریوژ ریخته شد. و در انتها ۱ μl از ویروس تهیه شده در مراحل تخلیص به انتهای رقت‌ها در لوله اضافه شد. لوله حاوی غلظت و نمونه را را به مدت نیم ساعت همراه روتور مربوطه در یخچال نگهداری شد. قبل از انتقال به یخچال با دقت زیر هود بالانس انجام شد.

سانتریفیوژ با دور ۲۵ هزار rpm و به مدت ۳ ساعت تحت شرایط خلا در دستگاه الترا سانتیفریوژ مدل SORVALL-OTD ۶۵ انجام شد. در انتها یک هاله‌ای در قسمت میانی لوله تشکیل شد و توسط پمپ پاستور جدا گردید. مقدار ۱ μl ویروس به همراه مایع آن جمع‌آوری شد. سپس به منظور جداسازی باقی مانده ساکارز از ویروس مایع جمع‌آوری شده به همراه ۱۲ μl PBS و با دور ۳۰ هزار rpm و به مدت ۴ ساعت سانتیفریوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و آنچه در ته لوله باقی ماند به عنوان ویروس تخلیص شده به همراه ۱۰۰ μl PBS استریل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

استخراج RNA و تهیه cDNA

با استفاده از کیت استخراج (Roche) ژنوم RNA ویروس استخراج شد. برای تهیه cDNA ابتدا یک پرایمر (gsp) باتوالی ACCAAACAGAGAATCCGTGAGTTA که در ابتدای ژنوم ویروس می‌چسبد، طراحی، و سفارش داده شد. برای ساخت cDNA مقادیر ۱ μl از پرایمر مورد نظر به همراه ۵ μl از RNA ویروس و ۵/۵ μl آب مناسب در یک میکروتیوب ریخته و به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد به همراه ۴ μl بافر و ۱ μl ۲ dNTP و در نهایت ۱ μl آنزیم در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت ساخت cDNA انجام شد.

انجام PCR

برای کسب نتیجه مناسب بدون در نظر گرفتن طول پروتئین F و طول مناسب برای کلونینگ، جفت پرایمر که در (جدول ۱) آمده است، طراحی گردید.

PCR با آنزیم Pfu طبق مقادیر ذکر شده در (جدول ۲) و در حجم نهایی ۵۰ μl و با سیکل دمایی زیر انجام شد. PCR در چرخه دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه، دمای ۹۵ درجه

می‌باشد. از اهمیت این جایگاه این است که OIE توالی اسید آمینه‌های جایگاه شکست را به عنوان شاخص برای تعیین پاتولوژی این ویروس پذیرفته است (۱، ۱۰). شناخت توالی نوکلئوتیدی این پروتئین می‌تواند در شناخت و مطالعه تغییرات و تاثیر آن در جایگاه‌های ژنوتیپی ویروس موثر باشد، و می‌توان درخت فیلوژنیکی را بر اساس این پروتئین ترسیم کرد تا بتوان جایگاه سویه‌های ویروس نیوکاسل در مقایسه با ژنوتیپ‌های مختلف را با دقت بیشتری مطالعه کرد (۵).

واکسن IR ۱۲ به عنوان ویروس کلون شده از سویه لاسوتا به صورت انبوه در موسسه رازی تولید و در صنعت طیور استفاده می‌شود (۶). در این مطالعه توالی نوکلئوتیدی ژن F با روش کلونینگ به طور کامل تعیین سکانس گردیده است. هدف از این مطالعه ایجاد شناسنامه ژنی برای این سویه بر اساس توالی پروتئین F و نیز تایید جایگاه شکست به عنوان یک ویروس لنتوژنیک می‌باشد. در کنار آن ترسیم درخت فیلوژنیکی بر اساس پروتئین فیوژن و تعیین جایگاه ژنوتیپی سویه لاسوتای موسسه رازی در مقایسه با سویه‌های ثبت شده در بانک ژن نیز انجام گرفت (۳).

مواد و روش‌ها

تکثیر و خالص‌سازی ویروس

برای تعیین توالی ویروس ابتدا باید ویروس در بستر مناسب تکثیر پیدا کند. برای این منظور سویه ویروسی کلون IR ۱۲ از بخش تولید واکسن‌های طیور موسسه رازی تهیه شد. سویه ویروس با رقت ml ۱۰-۵ به صد عدد تخم‌مرغ (SPF) جنین دار ده روزه و داخل فضای آلانتوئیک تزریق شد. سپس به مدت ۷۲ ساعت در درجه سانتی‌گراد ۳۷ انکوبه گردید. پس از پایان ۷۲ ساعت مایع آلانتوئیک به صورت استریل جمع‌آوری شد.

برای سنجش رشد ویروس نیو کاسل تست HA انجام گرفت. به منظور خالص‌سازی مایع آلانتوئیک از سانتیفریوژ دور بالای SURVALL مدل B-RC۲ استفاده شد. بدین صورت که ابتدا به منظور ته نشینی گلوبول قرمز و عوامل دیگر مایع آلانتوئیک مدت بیست دقیقه با دور rpm ۴۰۰۰ سانتیفریوژ شد و مایع‌رویی آن جمع‌آوری شد.

در مرحله دوم، برای رسوب ویروس، مایع جمع‌آوری به مدت دو ساعت با دور rpm ۱۴۰۰۰ سانتیفریوژ شد. مایع‌رویی دور ریخته شد و پلیت انتهایی تشکیل شده به همراه ۲۵۰ μl PBS جمع‌آوری شد و در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور خالص‌سازی بیشتر ویروس از دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خارج گردید و به روش گرادیانت ساکارز به صورت زیر خالص‌سازی نهایی انجام گرفت.

جدول ۱- مشخصات پرایمر طراحی شده برای ژن F

اندازه محصول	تعداد نوکلئوتید	توالی پرایمر
۱۸۷۱	۲۴	۳'-YTGCTTATAGTTAGTTYACCTGTC-۵'
	۲۰	۳'-ACCCGTGTATTGCTYTTYGG-۵'

مهندسی شده TOP10 انتخاب شد، این سلول مستعد قبل از ligation تهیه، و با کمک CaCl_2 حفرات مناسب بر روی باکتری برای ترانسفورماسیون ایجاد شد (۹).

کلونینگ قطعه با مقدار $14 \mu\text{l}$ از محصول استخراج شده PCR به همراه $11 \mu\text{l}$ پلاسمید و $11 \mu\text{l}$ DNA Ligase T4 به همراه $10 \mu\text{l}$ بافر در حجم نهایی $120 \mu\text{l}$ انجام شد. پس از کلونینگ انتقال آن به میزبان با شوک حرارتی انجام شد. سلول ترانسفرم شده در محیط LB Agar حاوی $50 \mu\text{g}$ آمپی سیلین با هدف رشد باکتری و پلاسمیدهای حاوی آن کشت داده شد. پس از ۱۶ ساعت پرگنه‌های سفید رنگی ایجاد شد. پرگنه‌ها استحصال، و در نهایت پلاسمید آن به طبق پروتکل Sambrook استخراج گردید (شکل ۲). برای اطمینان از وجود قطعه مورد نظربه صورت همزمان از PCR کلونی و برش آنزیمی BglIII استفاده شد. آنزیم ذکر شده بدون ایجاد برش روی قطعه کلون شده، دو برش روی پلاسمید در دو طرف ناحیه MCS ایجاد می‌کند. برای این کار ابتدا $11 \mu\text{l}$ از نمونه در یک میکروتیوپ ریخته شد و $11 \mu\text{l}$ از آنزیم BglIII به همراه بافر آنزیم به آن اضافه شد. و مدت دو ساعت در 37°C درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. همین طور برای مقایسه بهتر نتایج، پلاسمیدهای استخراج شده به صورت مستقیم PCR انجام شد. بدین صورت که با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای مرحله قبل کلونینگ و زمان و پروتکل قبلی PCR انجام شد. سپس نتیجه هر دو روش را بر روی ژل آگارز ۱٪ برده و نتیجه بررسی شد (شکل ۳). در نهایت پلاسمید استخراج شده که توالی مورد نظر داخل آن کلون شده است برای تعیین توالی به شرکت تجاری مناسب فرستاده شد. به همراه آن نوع پلاسمید برای استفاده از پرایمرهای مناسب وکتور برای خوانش به شرکت ارسال شد. پس از اخذ نتایج، اطلاعات حاصل با کمک نرم‌افزار مگا ۵ ارزیابی و مطالعه شد. بدین صورت که توالی‌های تعیین سکانس شده در دو خوانش هزارتایی به صورت خام از شرکت دریافت شد.

سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه برای ادامه واسرشت‌سازی آغاز شد. برای اتصال پرایمر ۳۰ ثانیه با دمای 54°C درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. مرحله طویل شدن $5:10$ با دما 72°C درجه سانتی‌گراد تعیین گردید. این سیکل ۳۵ بار انجام شد و برای طویل شدن نهایی دمای درجه سانتی‌گراد 72°C در نظر گرفته شد.

انجام الکتروفورز و استخراج از روی ژل

بعد از انجام PCR باید محصول آن بر روی ژل برده شود. بدین منظور ژل ۱٪ آگارز با چاهک‌های مناسب تهیه شد. بر روی ژل آگارز تمام محصول PCR در کنار مارکر 100 bp کمپانی (Vivantis) لود گردید. تانک الکتروفورز به یک منبع تغذیه الکتریکی با ولتاژ حدود 7100 متصل شد و پس از گذشت ۷۰ دقیقه ژل از داخل تانک برداشته شد. در نهایت در دستگاه آشکارساز (ژل داگ) باند به طول 1871 bp را مشاهده شد. مرحله بعد جداسازی باند از روی ژل بود که با رعایت اصول حفاظتی از اشعه UV، توسط اسکالپل به سرعت جدا شد تا قطعات ژنومی تحت تاثیر اشعه UV تغییر نکند (شکل ۱).

استخراج از روی ژل باید قبل از کلونینگ انجام شود. برای این منظور از کیت استخراج شرکت (Roche) استفاده شد. طبق دستور العمل کیت که بر پایه فیلتر و بافر و سانتی‌فوژ می‌باشد، DNA از روی ژل استخراج شد و با روش نانو دراپ غلظت آن سنجیده شد. در نهایت آماده کلون کردن بر روی وکتور مناسب شد.

کلونینگ

پلاسمید pJET ۱,۲ به عنوان وکتور مناسب تهیه شد. این وکتور دارای طول 2974 باز می‌باشد و توانایی حمل قطعات Blunt را دارد. این وکتور دارای نشانگر ژن مقاومت آمپی‌سیلین می‌باشد. سلول میزبان نیز باکتری

جدول ۲- مقادیر انجام PCR با استفاده از آنزیم Pfu

مقادیر	محلول ها
$35 \mu\text{l}$	Water
$5 \mu\text{l}$	Buffer S(with mgCl_2)
$1 \mu\text{l}$	DMSO
$2 \mu\text{l}$	dNTP10 mM
$1 \mu\text{l}$	$50 \mu\text{l}$ pfu
$1/5 \mu\text{l}$	F Primer (10uM)
$1/5 \mu\text{l}$	R Primer (10uM)
$3 \mu\text{l}$	cDNA templet
$50 \mu\text{l}$	مقدار نهایی

بدست آمد.

نتایج این مطالعه نتایج مطالعات بر روی این ویروس، توسط دکتر ابراهیمی و همکاران در موسسه رازی انجام گرفته بود را تایید می‌کند. این توالی با مطالعه مشابه دکتر ابراهیمی به صورت کامل هم‌مدیف می‌باشد (۶). اما در این مطالعه با توجه به طول مناسب قطعه کلون شده که اندازه مناسبی از دو طرف ژن را پوشش می‌دهد (بیش از ۱۰۰ نوکلئوتید در هر طرف)، نواحی بین ژنی توالی‌های ژن F به صورت کامل تعیین توالی شده است. (شکل ۶)

درخت فیلوژنتیک سویه IR ۱۲ به روش Neighbor-joining بر اساس ژن F ترسیم شده است (۵). لاسوتای موسسه رازی در مقایسه با توالی‌های بانک ژن استفاده شده در ترسیم درخت فیلوژنی در ژنوتیپ دو قرار گرفت (شکل ۷). در این شاخه سویه لاسوتای پیترز و دو سویه لاسوتای ژانگ و لو زوآ از چین نیز قرار گرفت و همین طور با سویه B1 جدا شده از بوقلمون نیز قرابت دارد و در یک شاخه قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری کلی

ناپایداری جدایه‌های مختلف و تفاوت‌های آن در اسید آمینه‌های پروتئین F در پاساژهای مختلف و همین طور در چرخه آن در طبیعت دیده شده است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ در چین صورت گرفت، سویه TS09-C که در طی پاساژهای متعددی از سویه V4 در سلول BHK-21 بدست آمده بود، تعیین توالی گردید. پس از این مطالعه توالی اسید آمینه در سایت شکافت پروتئین F به صورت (117)G-K-Q-R-R-L در سویه C-TS⁰⁹ تعیین شد. این توالی اسید آمینه در V4 به صورت (117)G-K-Q-G-R-L(112) می‌باشد همانطور که مشاهده می‌شود، اسید آمینه گلیسین جایگزین آرژنین شده است (۸). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۵ در روسیه سویه جدا شده‌ای تعیین توالی گردید که نتایج آن با سویه‌های کره جنوبی و ژاپن قرابت معنی‌داری داشت (۱۱).

بررسی دیگری در آمریکای جنوبی نشان داد که سویه توالی‌یابی شده قرابت نزدیکی با سویه لنتوژنیک لاسوتای بومی آمریکای جنوبی داشت

خوانش‌ها در کنار توالی‌های ذکر شده بانک ژن (جدول ۳) در برنامه مگا ۵ قرار گرفت ابتدا هم‌مدیف‌سازی انجام شد و نقطه AUG یا کدون آغازی و توالی پلی A انتهایی ژن مشخص شد. در مرحله بعد هم‌مدیف‌سازی، نقاط و نوکلئوتیدهایی که با ایجاد جهش تغییر پیدا کرده بودند مشخص شد و تاثیر این جهش‌ها در تغییر اسید آمینه موثر مطالعه شد.

نتایج و بحث

مقایسه ژنوم پروتئین F

این پروتئین مهم‌ترین نقش را در تعیین حدت ویروس دارد و هر گونه تغییر بخصوص در جایگاه شکست (۱۱۷-۱۱۲) آمینو اسیدپروتئینی می‌تواند در حدت این ویروس موثر باشد، توالی‌های تعیین حدت در توالی‌های بین ۱۱۷-۱۱۲ نمونه مورد مطالعه دقیقاً حفظ شده و سویه لنتوژنیک آن را اثبات گردید. همین طور این نمونه با سکانس پیترز در توالی پروتئینی به صورت صد در صد هم‌مدیف می‌باشد (شکل ۴). این توالی با نمونه سکانس شده ژانگ در چین در جایگاه ۳۵۷ نوکلئوتیدی متفاوت است. در (جدول ۳) مشخصات توالی‌های ویروس لاسوتا که با این سکانس مقایسه شده است آمده است.

توالی پروتئینی در جایگاه شکست نیز در (شکل ۵) به صورت 112G-R-Q-G-R-L117 مشخص است. این نتیجه با مشخصات ویروس‌های لنتوژنیک به صورت زیر 112G/E-K/R-Q-G/E-R-L117 همخوانی دارد (۷).

بررسی‌های گسترده بر روی جایگاه شکست ویروس‌های مختلف نشان داده است که وجود اسیدآمینه فنیل آلانین در جایگاه ۱۱۷ و اسید آمینه‌های بازی، در جایگاه‌های ۱۱۵ و ۱۱۶ و یک نوع اسید آمینه بازی (R) در جایگاه ۱۱۳ نیاز است تا ویروس برای طیور حدت داشته باشد (R/K-R-Q-K/R-R-F 117 112).

آنچه در (شکل ۵) دیده می‌شود توالی پروتئین‌های مشخصی است که نقش اصلی را در لنتوژنیک بودن ویروس دارند. در نهایت تمام ۱۷۹۲ نوکلئوتید ژن F به طور کامل توالی‌یابی گردید و به صورت (شکل ۶)

جدول ۳- مشخصات توالی‌های کامل بانک ژن که با سکانس بدست آمده مقایسه شده است.

نویسندگان	کدهای بانک ژن
de Leeuw, O. and Peeters, B(1998)	AF077761
Lu, Y., Zhao, H.(2011)	JF950510
Romer-Oberdorfer, A., Mundt, E(1999)	Y18898
Zhang, X.L., Menu, C.C.(2013)	KC844235
Bu, Z., Ge, J., Hu, S. and Wen, Z(2005)	AY845400

- L. Killian, Corrie C. Brown, Patti J. Miller, Claudio L. Afonso. 2012. Complete Genome and Clinicopathological Characterization of a Virulent Newcastle Disease Virus Isolate from South America. *Journal of Clinical Microbiology* 50(2): p. 378-387.
6. Ebrahimi MM, Shahsavandi S, Famil-Ghadakchi H, Masoudi S, Ghodsian N, Ebrahimi SR, Abdoshah M. 2014. Clone Purification, Characterization and Standardization of LaSota Strain for Developing a Live Vaccine against Newcastle Disease Virus. *Iranian Journal of Virology* 8(4): p. 12-19.
7. Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S. 2014. Newcastle disease virus: current status and our understanding. *Virus Research* 184:71-81.
8. Guoyuan Wen, Yu Shang, Jing Guo, Chen Chen, Huabin Shao, Qingping Luo. 2013. Complete genome sequence and molecular characterization of thermostable Newcastle disease virus strain TS09-C. *Virus Genes* 46(3): p. 542-54.
9. Kavitha Murulitharan, Khadijah Yusoff, Abdul Rahman Omar, Aidin Molouki. 2013. characterization of Malaysian velogenic NDV strain AF2240-I genomic sequence: a comparative study. *Virus Genes* 46(3): p. 431-40.
10. Bruschke C, Vallat B. 2008. OIE standards and guidelines related to trade and poultry diseases. *Revue scientifique et technique*. 27(3):62
11. Yurchenko KS, Sobolev IA, Glushchenko AV, Shestopalov AM. 2015. Complete Genome Sequence of Genotype Ib Newcastle Disease Virus Isolated from a Mallard (*Anas platyrhynchos*) in Russia. *Genome Announc* 3(6) pii: e01414-15.
12. Yurchenko KS, Zhou P, Kovner AV, Zavjalov EL, Shestopalova LV, Shestopalov AM. 2018. Oncolytic effect of wild-type Newcastle disease virus isolates in cancer cell lines in vitro and in vivo on xenograft model. *PLoS ONE* 13(4): e0195425.
13. Westbury H. 2001. Newcastle disease virus: an evolving pathogen. *Avian Pathology* 30(1):5-11.
- که به نقش سویه‌های غیربیماری‌زا و واکسینال در ایجاد سویه‌های ژنوتیپ‌های مختلف و چرخش ویروس در میزبان‌های مختلف تأکید می‌کند (۵).
- مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تغییرات این سویه تغییرات معنی‌دار نداشته و همین‌طور بر لنتوژنیک بودن سویه تأکید می‌کند. این سویه با سویه مطالعه شده توسط پیترز در سال ۱۹۹۹ بیشترین قرابت را دارد (۴). از آنجا که سویه کلون سویه مشتق شده از لاسوتا می‌باشد پیشنهاد می‌شود سویه لاسوتا نیز با این روش بررسی و تفاوت‌های آن با سویه کلون بررسی گردد.
- با توجه به گران بودن و عدم دسترسی مناسب به روش NGS پیشنهاد می‌شود سویه‌های واکسینال ویروس نیوکاسل با این روش تعیین توالی گردد و همین‌طور می‌توان پروتئین‌های دیگر هر سویه را با این روش مطالعه کرد.

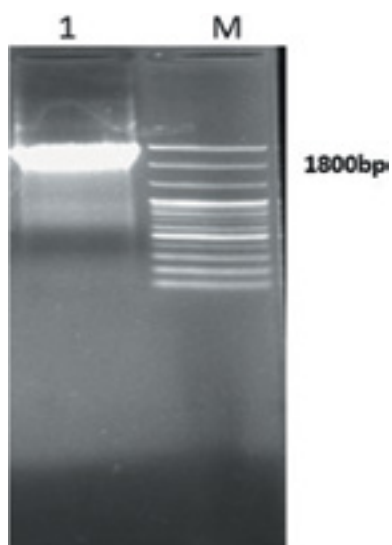
تشکر و قدردانی

از آقایان دکتر محمد مجید ابراهیمی و دکتر محسن بشاشتی و همه همکاران بخش تشخیص بیماری طیور نهایت تشکر و قدردانی می‌شود.

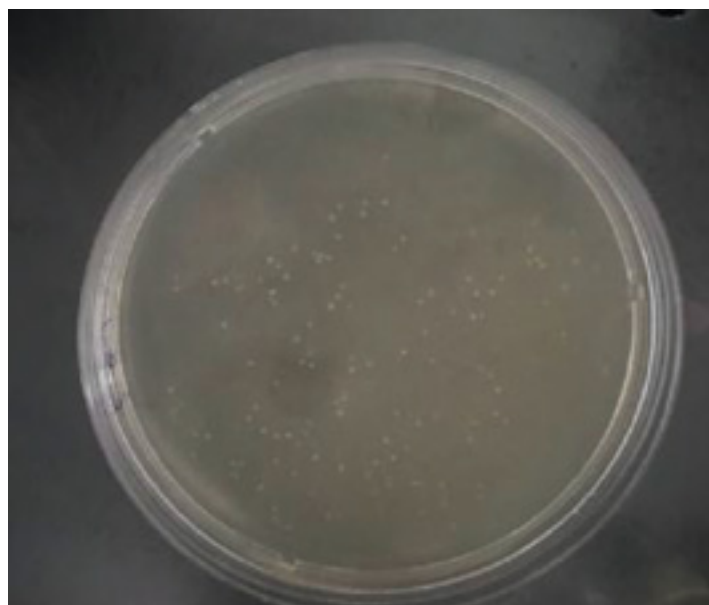
منابع مورد استفاده

1. Aldous, E.W. and D.J. Alexander. 2001. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathology* 30(2): p. 117-28.
2. Alexander, D.J., E.W. Aldous, and C.M. Fuller. 2012. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathology* 41(4): p. 329-335.
3. Angel E. Absalón; Andrea Mariano; Matías Alejandra; Vásquez-Márquez Andrés; Morales; Garzón Diana V. Cortés-Espinosa. 2012. Complete genome sequence of a velogenic Newcastle disease virus isolated in Mexico. *Virus Gene* 45(2): p. 304-10.
4. de Leeuw, O. and Peeters. 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae, *J. Gen. Virol* 80 (Pt 1), 131-136.
5. Diego G. Diel, Leonardo Susta, Stivalis Cardenas Garcia, Mary



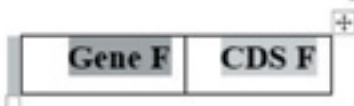


شکل ۱- الکتروفورز کل محصول PCR بر روی ژل آگارز. M: مارکر.



شکل ۲- وضعیت و تعداد کلونی‌ها را پس از کلونینگ کردن در محیط LB Agar نشان می‌دهد.

ACGGGTAGAAGATTCTGGATCCCGGTTGGCGCCCTCCAGGTGCAAGATGGGCTCCAGACCTTCTACCAAGAAC
 CCAGCACCTATGATGCTGACTATCCGGGTTGCGCTGGTACTGAGTTGCATCTGTCCGGCAAACCTCATTGATGG
 CAGGCCTCTTGACAGTGCAGGAATTGTGGTTACAGGAGACAAAGCCGTCAACATATACACCTCATCCAGACA
 GGATCAATCATAGTTAAGCTCCTCCCGAATCTGCCAAGGATAAGGAGGCATGTGCGAAAGCCCCCTTGGATG
 CATAACAAGGACATTGACCACTTGTCTCACCCCCCTTGGTACTCTATCCGTAGGATACAAGAGTCTGTGACT
 ACATCTGGAGGGGGGAGACAGGGGCGCCTTATAGGCGCCATTATTGGCGGTGTGGCTCTTGGGGTTGCAACT
 GCCGCACAAATAACAGCGGCCGAGCTCTGATACAAGCCAAACAAAATGCTGCCAACATCCTCCGACTTAAAG
 AGAGCATTGCCGAACCAATGAGGCTGTGCATGAGGTCACTGACGGATTATCGCAACTAGCAGTGGCAGTTG
 GGAAGATGCAGCAGTTTGTAAATGACCAATTAATAAAACAGCTCAGGAATTAGACTGCATCAAAATTGCACA
 GCAAGTTGGTGTAGAGCTCAACCTGTACCTAACCGAATTGACTACAGTATTCGGACCACAAATCACTTCACTG
 CTTTAAACAAGCTGACTATTCAGGCACCTTACAATCTAGCTGGTGGAAATATGGATTACTTATTGACTAAGTTA
 GGTGTAGGGAACAATCAACTCAGCTCATTAAATCGGTAGCGGCTTAATCACCGGTAACCCTATTCTATACGACTC
 ACAGACTCAACTCTTGGGTATACAGGTAACCTTACCTCAGTCGGGAACCTAAATAATATGCGTGCCACCTACT
 TGGAAACCTTATCCGTAAGCACACCAGGGGATTTGCCTCGGCACCTTGTCCCAAAGTGGTGACACAGGTCGG
 TTCTGTGATAGAAGAAGCTTGACACCTCATACTGTATAGAAAAGTACTAGATTTATATTGTACAAGAATAGTAA
 CGTTCCTATGTCCCTGGTATTTATTCTGCTTGAGCGGCAATACGTCGGCCTGTATGACTCAAAGACCGAA
 GCGCACTTACTACACCATACATGACTATCAAAGGTTCACTCATCGCCAACTGCAAGATGACAACATGTAGATG
 TGTAACCCCCCGGTATCATATCGCAAACTATGGAGAAGCCGTGTCTCTAATAGATAAAACAATCATGCAATG
 TTTTATCCTTAGGCGGGATAACTTTAAGGCTCAGTGGGGAAATTCGATGTAACCTATCAGAAGAATATCTCAATA
 CAAGATTCTCAAGTAATAATAACAGGCAATCTTGATATCTCAACTGAGCTTGGGAATGTCAACAACCTCGATCAG
 TAATGCTTTGAATAAGTTAGAGGAAAGCAACAGAAAAGTAGACAAAGTCAATGTCAAACCTGACTAGCACATCT
 GCTCTACCTATATCGTTTTGACTATCATATCTCTGTTTTGGTATACTTAGCCTGATTCTAGCATGCTACCT
 AATGTACAAGCAAAAGGCGCAACAAAAGACCTTATTATGGCTTGGGAATAATACTCTAGATCAGATGAGAGCC
 ACTACAAAATGTGAACACAGATGAGGAACGAAGGTTTCCCTAATAGTAATTTGTGTGAAAGTTCTGGTAGTC
 TGTCAAGTTGAGAGAGTTAAGAAAAAA



شکل ۶ - توالی کامل ژن F ویروس نیوکاسل توالی های به رنگ خاکستری روشن توالی ژن F را نشان می دهد و توالی های خاکستری تیره منطقه بین ژنی را نشان می دهد

