

## مطالعه مولکولی آلودگی به ویروس لکوز تحت گروه J در گله‌های اجداد گوشتی در ایران

ذوالفقار رجبی محمد حسن بزرگمهری فرد\* سید مصطفی پیغمبری

گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۶ تیر ماه ۱۳۸۶، پذیرش نهایی: ۲۱ اسفند ماه ۱۳۸۶)

### چکیده

ویروس تحت گروه J لکوز پرنندگان (ALV-J) در اواخر دهه ۱۹۸۰ در انگلیس در جوجه‌های گوشتی جدا شد. ویروس‌های تحت گروه J به استثناء واریانت‌های حاد معمولاً با دوره کمون طولانی باعث ایجاد لکوز می‌شوند. در این مطالعه ضمن ارزیابی پرایمرهای مختلف و بعضی از روش‌های تشخیص مولکولی، وضعیت ویروس تحت گروه J لکوز پرنندگان در شش آمیخته اجداد گوشتی در ایران بررسی شدند. برای این منظور از هر آمیخته گوشتی ۱۰۰ نمونه خون حاوی ماده ضد انعقاد، ۱۰۰ نمونه مخلوط سلول‌های سفید خون و پلاسما و ۱۰۰ نمونه پالپ پر بصورت کاملاً تصادفی جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها با روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور کاهش تعداد نمونه‌های مورد آزمایش در هر آمیخته، نمونه‌ها قبل از استخراج DNA با هم مخلوط می‌شدند. مطالعه مولکولی به روش PCR و nested-PCR با پرایمرهای مختلف، روی مخلوط سلول‌های سفید خون و پلاسما، خون و پالپ انجام گرفت. در روش PCR نمونه مثبتی جدا نشد ولی در روش nested-PCR از شش آمیخته گوشتی، پنج آمیخته به پرو ویروس تحت گروه J آلوده بودند. بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق اکثر آمیخته‌های اجداد گوشتی موجود در ایران به ویروس تحت گروه J لکوز پرنندگان آلوده است. همچنین مشخص شد با مخلوط کردن نمونه‌ها و استفاده از روش مولکولی حساس تر (nested-PCR) انجام مطالعه فارمی ویروس تحت گروه J لکوز پرنندگان تسهیل می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اجداد گوشتی، ویروس تحت گروه J، روش مولکولی.

است که بعضی از آنها باعث ترانسفورماسیون حاد می‌شوند. ویروس‌های تحت گروه J بر خلاف سایر تحت گروه‌های لکوز پرنندگان، در انتقال افقی در هفته‌های اول معمولاً تحمل پادگنی ایجاد می‌کند. به همین دلیل کنترل و ریشه‌کنی بیماری و عفونت ناشی از آن مشکل می‌باشد. ویروس‌های تحت گروه J به استثنای واریانت‌های حاد، بدلیل نداشتن انکوژن ویروسی در ژنوم، معمولاً با دوره کمون طولانی باعث ایجاد لکوز می‌شوند. در جوجه‌های مادر گوشتی می‌شوند. در حال حاضر بیماری ناشی از ALV-J (لکوز میلوئید) در گله‌های گوشتی شیوع دارد و موجب خسارات اقتصادی سنگین می‌شود. ظهور سویه‌های جدید ALV موجب ایجاد بیماری‌های جدید در صنعت طیور می‌شود. بنابراین تداوم مراقبت و پیشرفت در روش‌های تشخیصی و درک بهتر مکانیسم بیماری‌زایی ALV برای کاهش خسارات حاصل از ویروس‌های جدید ضروری است (۴، ۵، ۷، ۱۲، ۱۵).

روش‌های متعددی برای شناسایی ویروس‌های لکوز پرنندگان وجود دارد ولی اغلب آنها نیاز به سلول‌های با فنوتیپ مشخص دارند و زمانبر می‌باشند. محققان در تلاش هستند تا روش‌های تشخیصی مناسبتری ابداع کنند (۱۰). با توجه به اهمیت این بیماری و از آنجا که هنوز هیچ گزارشی در مورد این بیماری از ایران منتشر نشده است و بدلیل اینکه مطالعات انجام گرفته در جهان باروش‌های مولکولی عمدتاً محدود به مطالعات تجربی بوده و در سطح فارم انجام نگرفته بود این مطالعه با هدف (۱) بررسی وضعیت تحت گروه J لکوز پرنندگان در گله‌های اجداد گوشتی ایران با استفاده از روش‌های PCR و nested-PCR، و (۲) انتخاب پرایمر مناسب و ارزیابی بعضی از روش‌های تشخیصی موجود در سطح فارم انجام گرفت.

### مقدمه

رتروویروس‌های پرنندگان که به عنوان ویروس‌های لکوز پرنندگان شناخته می‌شود (ALVs) عامل بیماری‌های گروه لکوز/سارکوما در پرنندگان می‌باشند. بیماری‌های گروه لکوز/سارکوما تنوعی از نئوپلاسم‌های قابل انتقال خوش خیم و بد خیم از جمله، لکوزها، تومورهای بافت همبند، تومورهای اپی تلیال و تومورهای اندوتلیال در ماکیان هستند. لکوزها خود شامل لکوز لنفوئید، اریتروبلاستوز، میلو بلاستوز و میلو سیتوما می‌باشند. در حال حاضر شایع‌ترین بیماری‌های گروه لکوز/سارکوما در گله‌ها، لکوز لنفوئید است که اخیراً لکوز میلوئید نیز در بین گله‌های مادر گوشتی شیوع یافته است. گسترش بیماری لکوز از لحاظ اقتصادی اهمیت زیادی دارد. خسارات اقتصادی، ناشی از افزایش تلفات (۲-۱ درصد که گاهی به بیش از ۲۰ درصد می‌رسد)، کاهش تولید و هزینه ریشه‌کنی بیماری است، که تخمین زده می‌شود میلیون‌ها دلار در سال باشد. کنترل بیماری با واکسن‌ها بدلیلی از جمله تحمل پادگنی موفقیت آمیز نبوده است. انجام برنامه‌های ریشه‌کنی در سطح گله‌های مادر گرچه موجب کاهش بروز بیماری‌های نئوپلاستیک ناشی از ALVs در صنعت طیور طی ۳۰ سال گذشته شده و تغییرات در جمعیت ALVs در این دوره به حداقل کاهش یافته است، ولی در اواخر دهه ۱۹۸۰ در انگلستان تحت گروه جدید ALV، تحت گروه J ویروس لکوز پرنندگان (ALV-J) ظاهر و به سرعت در صنعت طیور جهان انتشار یافت. این ویروس حاصل نوترکیبی ویروس‌های انکوژن و آندوژن است. تغییرات آنتی ژنیک ناشی از نوترکیبی و جهش‌های نقطه‌ای باعث تولید واریانت‌های متعدد شده



تحت گروه J می توان ژنوم ویروس (RNA) را بصورت مستقیم جستجو و شناسایی کرد و یا با توجه به مکانیسم تکثیر ویروس در سلول میزبان، ویروس را بصورت غیر مستقیم از طریق جستجوی پروویروس در ژنوم میزبان شناسایی کرد. در این مطالعه هدف جستجوی پروویروس بود که برای این منظور لازم است ابتدا ژنوم سلول میزبان را که احتمالاً پروویروس به آن الحاق یافته از سلول خارج شود. نمونه های که برای استخراج استفاده شد شامل مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما، مخلوط پلاسما بافی کوت و سلولهای قرمز خون و پالپ پر بود. برای استخراج DNA کیت سلولهای قرمز خون و پالپ پر High Pure PCR Template Preparation (Roche) بکار گرفته شد.

**استخراج DNA از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما و مخلوط پلاسما، بافی کوت و سلولهای قرمز خون (خون):** از آنجا که هدف، مطالعه آلودگی و عفونت گله به ویروس لکوز J بود و نه مطالعه انفرادی مرغها، لذا به جهت بهره برداری مناسب از بودجه طرح و ارزیابی حساسیت تکنیکهای PCR و nested PCR و تعیین تکنیک مناسب برای مطالعه فارمی ویروس تحت گروه J، نمونه های مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما (۴۰ نمونه) و مخلوط پلاسما، بافی کوت و سلولهای قرمز خون در هر آمیخته گوشتی هر کدام به طور جداگانه با هم مخلوط شدند (۴۰ نمونه)، برای این منظور هر ۱۰ نمونه مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما یا ۱۰ نمونه خون از هر آمیخته گوشتی با هم مخلوط شدند به طوری که در نهایت تعداد نمونه ها از هر نوع نمونه به ۴ عدد کاهش یافت. به منظور استخراج DNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت ابتدا به ۲۰۰ μl از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما یا مخلوط پلاسما، بافی کوت و سلولهای قرمز خون، ۲۰۰ μl بافر اتصال دهنده و ۴۰ μl پرتئیناز K اضافه و سریعاً مخلوط شد، سپس در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ده دقیقه گرماگذاری شد. بعد از ده دقیقه به آن ۱۰۰ μl ایزوپروپانول اضافه و به خوبی مخلوط شد. با پیپت نمونه داخل لوله فیلترداری که داخل لوله جمع کننده بود گذاشته شد. بعد به مدت یک دقیقه با اولتراسانتریفوژ (Biotech international, Braun, AR15, B, Centrifuge) با دور ۸۰۰۰ در دقیقه سانتیفوژ گردید. لوله جمع کننده و مایع موجود داخل آن را کنار گذاشته و لوله فیلتردار داخل یک لوله جمع کننده جدید قرار داده شد. به داخل لوله فیلتردار ۵۰۰ μl بافر حذف کننده مهارکننده اضافه و مجدداً به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتیفوژ شد. بعد از سانتیفوژ لوله جمع کننده و مایع داخل آن کنار گذاشته و لوله فیلتردار داخل لوله جدید جمع کننده با دور ۸۰۰۰ سانتیفوژ گردید. برای تکمیل شستشو، لوله جمع کننده و مایع داخل آن کنار گذاشته شد و لوله فیلتردار داخل لوله جدید جمع کننده قرار گرفت و مجدداً ۵۰۰ μl بافر شستشو به لوله فیلتردار اضافه و سپس به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتیفوژ شد. بعد از سانتیفوژ مایع موجود داخل لوله جمع کننده دور ریخته شد و مجدداً لوله فیلتردار داخل همین لوله قرار داده شد و ده ثانیه با دور ۱۴۰۰۰ سانتیفوژ شد. لوله جمع کننده همراه با مایع داخل آن کنار گذاشته شد و لوله فیلتردار داخل یک لوله ۱/۵ ml استریل گذاشته شد

## مواد و روش کار

**گله های اجداد گوشتی:** با توجه به اینکه هدف از این مطالعه، بررسی عفونت گله های اجداد گوشتی در ایران بود، از تمام آمیخته های اجداد گوشتی موجود در ایران نمونه جمع آوری گردید. تعداد آمیخته های گوشتی مورد مطالعه شش آمیخته بود که برای نامگذاری آنها از حروف بزرگ انگلیسی استفاده گردید. گله های مورد مطالعه در گروه سنی ۵۹-۸ هفتگی قرار داشتند. گله A در سن ۸ هفتگی، گله B در سن ۱۲ هفتگی، گله C در سن ۴۸ هفتگی، گله D در سن ۵۹ هفتگی، گله E در سن ۳۵ هفتگی و گله F در سن ۳۷ هفتگی نمونه برداری شدند. نمونه ها به صورت کاملاً تصادفی جمع آوری شد. در این مطالعه نمونه ها به روش PCR و nested-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

**نمونه های مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما:** از یک فارم از هر آمیخته گوشتی، ۱۰۰ نمونه خون همراه با ماده ضد انعقاد اخذ شد. به این ترتیب که توسط سرنگ های دو میلی لیتر (ml) از ورید بالای آنها به حجم سرنگ خون اخذ شد، سپس به داخل لوله های آزمایش درب دار استریل که شماره گذاری شده و محتوی ماده ضد انعقاد بود (EDTA)، منتقل شد؛ غلظت EDTA یک میلی گرم در میلی لیتر خون 1mg/ml ( ) بود. سپس لوله ها در دمای یخچال به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در آزمایشگاه نمونه ها با دور چهار هزار به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شد. سلولهای سفید خون همراه با پلاسما به میکرو تیوبها مربوطه منتقل و روی آن شماره نمونه و تاریخ اخذ نمونه یادداشت و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

**نمونه های مخلوط پلاسما، بافی کوت و سلولهای قرمز خون (خون):** بعد از سانتریفوژ هر کدام از نمونه های خون و خارج کردن قسمت اعظم پلاسما، با پیپت مخلوطی از پلاسما، بافی کوت و خون به میکرو تیوب دیگری منتقل و بعد از شماره گذاری (مطابق با شماره نمونه مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما) و یادداشت تاریخ اخذ نمونه در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

**نمونه های پالپ پر:** بدنال اخذ نمونه خون از هر قطعه مرغ جهت تهیه نمونه های پالپ پر اقدام گردید. سه پر از قسمتهای مختلف بدن که واجد پالپ پر بود جدا و قسمت حاوی پالپ پرین درب میکرو تیوب و بدنه آن قرار داده شد و در دمای یخچال به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه، میکرو تیوب های حاوی پالپ پر توسط اولتراسانتریفوژ با دور ۱۴۰۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفوژ شد، بعد از سانتریفوژ و خروج پالپ پر از بدنه پر، بدنه آن از میکرو تیوب خارج و نمونه های پالپ پر که همه آنها مطابق با شماره نمونه خون و مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما شماره گذاری شده و تاریخ اخذ نمونه روی آنها نوشته شده بود تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

**استخراج DNA:** به منظور مطالعه رتروویروسها از جمله ویروس لکوز



غلظت و نوع مواد مورد استفاده در واکنش PCR شامل،  $2/5 \mu\text{M}$  از بافر  $10 \times \text{PCR}$  و  $\text{Mg}$  (  $1/5 \text{mM}$  )،  $1 \mu\text{L}$  از دئوکسی نوکلئوزید تری فسفاتاز مخلوط (Mixed dNTPs) با غلظت ۵ میلی مولار (5 mM)،  $1 \mu\text{L}$  از آغازگر Baf و  $1 \mu\text{L}$  از آغازگر Bar هر کدام با غلظت ۲۰ میکرومولار (20  $\mu\text{M}$ )،  $0/5$  واحد از آنزیم Taq با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (5unit/ $\mu\text{L}$ ) (Roche) و  $5 \mu\text{L}$  از DNA مورد آزمایش. حجم واکنش با آب مقطر استریل به  $25 \mu\text{L}$  رسانده می‌شد. از نظر شرایط دمایی و تعداد سیکل (۱۱،۱۲)، ابتدا ۴ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، سپس ۳۰ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتیگراد در مرحله دناتوراسیون ۳۰، ثانیه دمای ۵۸ درجه سانتیگراد در مرحله اتصال، ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد در مرحله تکثیر که در هر سیکل ۵ ثانیه با آن اضافه می‌شد. سه مرحله مذکور در ۳۵ سیکل انجام شد. به دنبال آن ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به عنوان دمای تکثیر نهایی برنامه ریزی شد. لازم به ذکر است برای واکنش PCR از دستگاه ترمال سایکلر گرادایانت اپندورف استفاده شد.

**واکنش PCR با آغازگرهای H5 و H7b:** آغازگر Smith H5 و همکاران در سال ۱۹۹۸ و Bagust H7b و همکاران در سال ۲۰۰۴ مشابه دو آغازگر قبلی برای تکثیر قسمتی از ویروس لکوز پرنندگان و ویروس تحت گروه J طراحی شده است. وزن مولکولی محصول PCR ۵۴۴ bp است. آغازگر H5 بصورت مستقیم و آغازگر H7b بصورت معکوس عمل می‌کند. واکنش در حجم  $25 \mu\text{L}$  انجام شد. غلظت و نوع مواد مورد استفاده در واکنش PCR شامل،  $2/5 \mu\text{M}$  از بافر  $10 \times \text{PCR}$  و  $\text{Mg}$  (  $1/5 \text{mM}$  )،  $1 \mu\text{L}$  از دئوکسی نوکلئوزید تری فسفاتاز مخلوط (Mixed dNTPs) با غلظت ۵ میلی مولار (5 mM)،  $1 \mu\text{L}$  از آغازگر H5 و  $1 \mu\text{L}$  از آغازگر H7b هر کدام با غلظت ۲۰ میکرومولار (20  $\mu\text{M}$ )،  $0/5$  واحد از آنزیم Taq با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (5unit/ $\mu\text{L}$ ) (Roche) و  $5 \mu\text{L}$  از DNA مورد آزمایش. حجم واکنش با آب مقطر استریل به  $25 \mu\text{L}$  رسانده می‌شد. از نظر شرایط دمایی و تعداد سیکل Smith و همکاران در سال ۱۹۹۸ مشابه با واکنش PCR با آغازگرهای Baf و Bar بود.

**واکنش PCR با آغازگرهای J5' و J3':** این جفت آغازگر (Zavala و همکاران در سال ۲۰۰۲) قادر به تکثیر تمام توالی‌های ژنوم بیان کننده پروتئین‌های غشای ویروس J-ALV است. وزن مولکولی محصول PCR، ۲۱۲۵ bp است. آغازگر J5' بصورت مستقیم و آغازگر J3' بصورت معکوس عمل می‌کند. واکنش در حجم  $25 \mu\text{L}$  انجام شد. غلظت و نوع مواد مورد استفاده در واکنش PCR شامل،  $2/5 \mu\text{L}$  از بافر  $10 \times \text{PCR}$  و  $\text{Mg}$  (  $1/5 \text{mM}$  )،  $1/25 \mu\text{L}$  از کلرید منیزیم با غلظت  $0/1$  مولار (0.01M  $\text{MgCl}_2$ )،  $1/5 \mu\text{L}$  از دئوکسی نوکلئوزید تری فسفاتاز مخلوط (Mixed dNTPs) با غلظت ۵ میلی مولار (5 mM)،  $1 \mu\text{L}$  از آغازگر Baf و  $1 \mu\text{L}$  از آغازگر Bar هر کدام با غلظت ۲۰ میکرومولار (20  $\mu\text{M}$ )،  $0/75$  واحد از آنزیم Taq با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (5unit/ $\mu\text{L}$ ) (Roche) و  $5 \mu\text{L}$  از DNA مورد آزمایش. حجم واکنش با آب مقطر استریل به  $25 \mu\text{L}$  رسانده می‌شد. از نظر شرایط دمایی و تعداد سیکل Smith و همکاران در سال ۱۹۹۸ مشابه با واکنش PCR با آغازگرهای

و به آن  $200 \mu\text{L}$  بافر Elution که قبل از استفاده دمای آن به ۷۰ درجه سانتیگراد رسانده شده بود اضافه گردید و به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ کمیته DNA موجود در مایع با بیوفتومتر (Biophotometer, Eppendorf) مشخص (3-20 ng/ $\mu\text{L}$ ) و نمونه‌ها تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

**استخراج DNA از پالپ پر:** روش استخراج DNA از پالپ پر مطابق با دستورالعمل توصیه شده شرکت سازنده کیت استخراج DNA بود. لازم به ذکر است، نمونه‌های پالپ پر (۱۰۰ نمونه) نیز همانند نمونه‌های قبلی با هم مخلوط شدند به طوری که در نهایت تعداد کل نمونه‌های پالپ پر در هر آمیخته به ۸ نمونه کاهش یافت. طبق دستورالعمل ابتدا از هر نمونه ۵۰ میلی گرم (mg) وزن شد، به آن  $200 \mu\text{L}$  بافر لیز کننده بافت و  $40 \mu\text{L}$  پروتئیناز K اضافه شد. بعد از مخلوط کردن به مدت ۱۲-۱ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد به طوری که بافت به طور کامل هضم شده بود. سپس  $200 \mu\text{L}$  بافر اتصال دهنده اضافه شد و بعد از مخلوط کردن به مدت ده دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. بعد از گرماگذاری  $100 \mu\text{L}$  ایزوپروپانل اضافه شد. بعد از مخلوط کردن با پیپت بافت‌های هضم نشده از محلول جدا و دور ریخته شد. محلول باقیمانده با پیپت به لوله فیلترداری که داخل لوله جمع کننده بود انتقال داده شد. سپس به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. لوله جمع کننده محتوی مایع، از لوله فیلتردار جدا و کنار گذاشته شد. مجدداً لوله فیلتردار داخل لوله جمع کننده قرار گرفت. به آن  $500 \mu\text{L}$  بافر حذف مهار کننده اضافه شد و به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. لوله جمع کننده محتوی مایع، کنار گذاشته شد و لوله فیلتردار داخل لوله جدید جمع کننده قرار داده شد. در ادامه  $500 \mu\text{L}$  بافر شستشو اضافه و به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ مجدداً لوله جمع کننده حاوی مایع از لوله فیلتردار جدا و کنار گذاشته شد. لوله فیلتردار داخل لوله جدید جمع کننده قرار گرفت، سپس یکبار دیگر  $500 \mu\text{L}$  بافر شستشو به لوله فیلتردار اضافه و به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع موجود در لوله جمع کننده را دور ریخته و لوله فیلتردار مجدداً داخل آن قرار داده شد، سپس به مدت ده ثانیه با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد تا همه مایع موجود در فیلتر خارج شود. بعد از سانتریفیوژ لوله فیلتردار داخل لوله  $1/5 \text{mL}$  قرار داده شد و بعد  $200 \mu\text{L}$  بافر Elution که قبل از استفاده دمای آن به ۷۰ درجه سانتیگراد رسانده شده بود به داخل لوله فیلتردار اضافه و به مدت یک دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد. مایع حاصل حاوی DNA بود که کمیته آن در دستگاه بیوفتومتر مشخص (3-20 ng/ $\mu\text{L}$ ) و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

**واکنش PCR با آغازگرهای Baf و Bar:** این جفت آغازگر، ژن  $\beta$ -actin با وزن مولکولی ۴۰۱ جفت باز (bp) را در DNA ژنومیک جوجه شناسایی می‌کند و بدین ترتیب حضور DNA جوجه و امکان تکثیر قسمتی از آن را در نمونه‌های استخراجی مشخص می‌کند. آغازگر Baf بصورت مستقیم و آغازگر Bar بصورت معکوس عمل می‌کند. واکنش در حجم  $25 \mu\text{L}$  انجام شد.



Bar و Baf بود.

**واکنش PCR با آغازگرهای H5 و H7:** این جفت آغازگر (Smith و همکاران در سال ۱۹۹۸) برای تکثیر قسمتی از ویروس لکوز پرندگان طراحی شده است. آغازگر H5 به ناحیه بالادست از 3' ژن pol متصل و قادر به شناسایی تحت گروههای مختلف ویروس لکوز پرندگان (ALV) است. آغازگر H7 به طور اختصاصی به ناحیه 5' کلیکو پروتئین 85 غشایی (gp85) ویروس ALV-J متصل و همراه با H5 قطعه‌ای با وزن مولکولی 545bp را تکثیر می‌کند. آغازگر H5 بصورت مستقیم و آغازگر H7 بصورت معکوس عمل می‌کند. واکنش در حجم ۲۵μl انجام شد. غلظت و نوع مواد مورد استفاده در واکنش PCR شامل، ۲/۵μl از بافر 10xPCR و اجد Mg (۱/۵mM) به علاوه ۱/۲۵۰l از mgcl2 با غلظت ۰/۰۱M، ۱μl از دئوکسی نوکلئوزید تری فسفاتاز مخلوط (Mixed dNTPs) با غلظت ۵ میلی مولار (5 mM)، ۱μl از آغازگر H5 و ۱μl از آغازگر H7 با غلظت ۲۰ میکرومولار (20μM)، ۰/۵μl فوراماید، ۰/۵ واحد از آنزیم Taq با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (5unit/μl) (Roche) و ۵μl از DNA مورد آزمایش. حجم واکنش با آب مقطر استریل به ۲۵μl رسانده می‌شد. از نظر شرایط دمایی و تعداد سیکل Smith و همکاران در سال ۱۹۹۸، به ترتیب، ۶۰ ثانیه دمای ۹۳ درجه سانتیگراد در مرحله دناتوراسیون، ۶۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه سانتیگراد در مرحله اتصال، در هر سیکل یک درجه از دمای آن کاسته می‌شد، ۱/۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد در مرحله تکثیر. بعد از ۱۳ سیکل واکنش در شرایط دمایی فوق، ۳۰ سیکل در شرایط دمایی زیر واکنش انجام شد. مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در دمای ۴۸ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱/۵ دقیقه، به دنبال آن ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به عنوان دمای تکثیر نهایی برنامه ریزی شد. واکنش PCR با آغازگرهای نسته (Leu3.2, Leu7R, Leu12R) (جفت آغازگر خارجی) و Leu11F, Leu12R (جفت آغازگر داخلی): این آغازگرها قسمتی از U3 و U5 ناحیه LTR ویروسهای اگزوزن لکوز پرندگان را تکثیر می‌کنند. وزن مولکولی محصول PCR در مورد تحت گروههای A, C و J تقریباً ۲۱۰bp و در مورد تحت گروه D, ۱۷۵bp و در مورد تحت گروه B, حدود ۲۲۰bp است. آغازگر خارجی Leu3.2 و آغازگر داخلی Leu11F بصورت مستقیم و آغازگر خارجی Leu7R و آغازگر داخلی Leu12R بصورت معکوس عمل می‌کنند (۶). برای کاهش آلودگی واکنش PCR نسته در یک میکروتیوب انجام گرفت. واکنش اول در حجم ۱۰μl انجام شد. غلظت و نوع مواد متشکل در این حجم شامل، ۱μl از بافر 10xPCR و اجد Mg (۱/۵mM)، ۰/۵μl کلرید منیزیم ۰/۱. مولار، ۱μl از دئوکسی نوکلئوزید تری فسفاتاز مخلوط (Mixed dNTPs) با غلظت ۱ میلی مولار (1 mM)، ۱μl از آغازگر Leu3.2 و ۱μl از آغازگر Leu7R، هر کدام با غلظت ۰/۵ میکرومولار (0.5μM)، ۰/۵ واحد از آنزیم Taq با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (5unit/μl) (Roche) و ۵μl از DNA مورد آزمایش. حجم واکنش با آب مقطر استریل به ۱۰μl رسانده شد. حجم دومین واکنش ۴۰μl بود. ۳μl از بافر 10xPCR و اجد Mg

(۱/۵mM)، ۰/۵μl کلرید منیزیم ۰/۱. مولار، ۱μl از دئوکسی نوکلئوزید تری فسفاتاز مخلوط (Mixed dNTPs) با غلظت ۵ میلی مولار (5mM)، ۱μl از آغازگر Leu11F و ۱μl از آغازگر Leu12R، هر کدام با غلظت ۲۰ میکرومولار (20μM)، ۰/۵ واحد از آنزیم Taq با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر (5unit/μl) (Roche) و ۱۰μl از محصول PCR حاصل از واکنش اول. حجم با آب مقطر استریل به ۴۰μl رسانده شد. واکنش اول و دوم از لحاظ شرایط دمایی یکسان بودند ولی از نظر تعداد سیکل باهم تفاوت داشتند. واکنش اول در ۱۵ سیکل انجام شد در حالی که واکنش دوم در ۳۵ سیکل انجام گرفت. مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

بعد از اتمام واکنش اول میکروتیوبها از ترمال سایکلر خارج شد و به هر کدام ۳۰μl از محلولی که بغیر از آغازگرهای خارجی حاوی ترکیبات واکنش اول به علاوه آغازگرهای داخلی بود اضافه گردید و مجدداً برای انجام واکنش دوم داخل ترمال سایکلر گذاشته شد.

همه واکنشهای PCR در کنار کنترل مثبت (بغیر از واکنش PCR با آغازگرهای Bar و Baf) و منفی انجام گرفت. کنترل مثبت پلاسمید نو ترکیب حامل ژنوم کامل ویروس لکوز J، سویه HPRS-103 بود (کنترل مثبت بنا به تقاضا توسط دکتر Venugopal از موسسه Health, Compton Laboratory Animal در انگلستان ارسال شده بود). در کنترل منفی به جای محلول محتوی DNA مورد آزمایش آب مقطر اضافه شد.

در کلیه واکنشهای PCR، بعد از اتمام واکنش محصول PCR با مستقیماً الکتروفورز شد و یا تا زمان الکتروفورز در دمای ۲۰- درجه یا دمای یخچال نگهداری گردید.

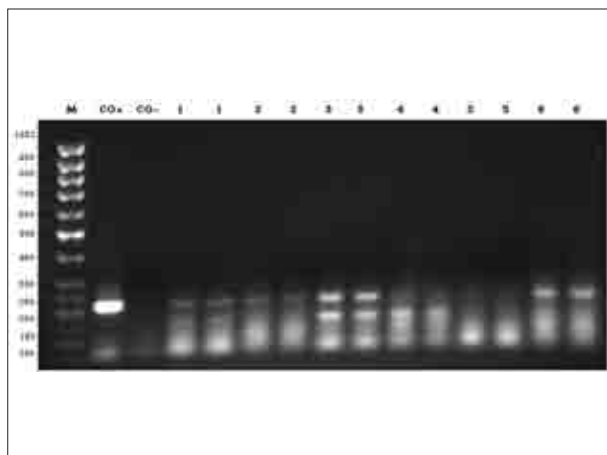
**الکتروفورز:** ارزیابی و جستجوی DNA تکثیر شده در واکنش PCR، به کمک روش الکتروفورز و طبق دستورالعمل کتاب molecular cloning انجام گرفت. سپس بانروی ترانس الیمیناتور مورد بررسی قرار گرفت و از آن عکسبرداری شد.

**Restriction fragment long polymorphism (RFLP):** با توجه به آنکه در برنامه نسته PCR، آغازگرهای مورد استفاده اختصاصی ALV-J نبوده و همه ویروسهای اگزوزن لکوز پرندگان را شناسایی می‌نماید. لذا برای تفریق تحت گروهها، بخصوص تحت گروههای A, C, J از همدیگر استفاده از آنزیمهای محدود کننده، TaqI و DdeI (Roche) برای تفریق تحت گروههای مذکور ضروری بود. آنزیم DdeI، محصول PCR ویروس لکوز J را به دو قطعه 120bp و 90bp تقسیم می‌کند، در حالی که تحت گروههای دیگر بدون هضم می‌مانند. آنزیم TaqI محصول PCR تحت گروههای A و C را به دو قطعه 135bp و 65bp تقسیم می‌کند و روی تحت گروه J تاثیری ندارد.

محصول PCR نمونه‌های که بعد از الکتروفورز واجد باند 210bp بودند تحت تاثیر آنزیمهای محدود کننده قرار گرفت. روش کار به این نحو بود که







تصویر ۲- واکنش PCR nested نمونه DNA های استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما، خون و پالپ پر (1,2,3,4,5,6) با استفاده از آغازگرهای نستد Leu3.2 Leu7R، F (جفت آغازگر خارجی) و Leu11F و Leu12R (جفت آغازگر داخلی)، CO+؛ کنترل مثبت (پلاسمید حامل پرو ویروس آمیخته HPRS-103). CO-؛ کنترل منفی. M؛ DNA مارکر 50bp (Fermentas).

کنترل مثبت در واکنش PCR تکثیر و با الکترو فورز باند 545bp قابل مشاهده داشت، هیچکدام از نمونه های مورد آزمایش مثبت نبودند.

#### واکنش PCR با جفت آغازگر H5/H7b: همه ۹۰ نمونه DNA استخراج

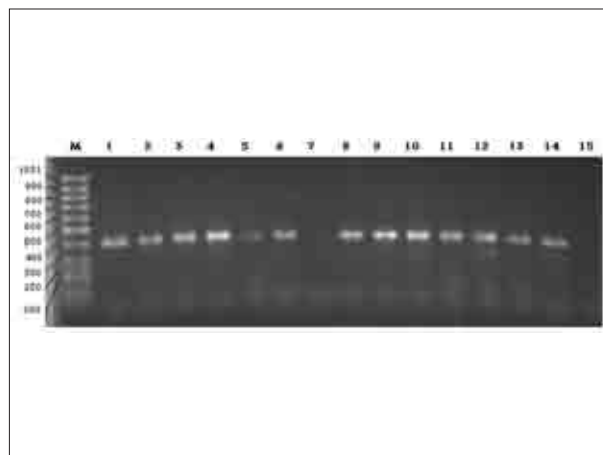
شده در کنار کنترل مثبت و کنترل منفی و مارکر انجام گرفت. علی رغم اینکه کنترل مثبت در واکنش PCR تکثیر و با الکترو فورز باند 544bp قابل مشاهده داشت، هیچکدام از نمونه های مورد آزمایش مثبت نبودند.

#### واکنش PCR با جفت آغازگر J52/J32: همه ۹۰ نمونه DNA استخراج

شده در کنار کنترل مثبت و کنترل منفی و مارکر انجام گرفت. علی رغم اینکه کنترل مثبت در واکنش PCR تکثیر و با الکترو فورز باند حدود ۲۱۲۵bp قابل مشاهده داشت، هیچکدام از نمونه های مورد آزمایش، مثبت نبودند.

#### واکنش PCR با آغازگرهای نستد (Leu7R، FLeu3.2) (جفت

آغازگر خارجی) و Leu11F و Leu12R (جفت آغازگر داخلی): همه ۹۰ (از هر آمیخته ۱۵ نمونه) نمونه DNA استخراج شده در کنار کنترل مثبت و کنترل منفی و مارکر انجام گرفت، همانطور که به عنوان نمونه در تصویر ۲ مشاهده می گردد ۲۲ مورد از نمونه ها همانند کنترل مثبت باند 210bp داشتند، لذا مشکوک به آلوده بودن به پرو ویروس J بودند (تحت گروههای A, C, J باند 210bp با آغازگرهای نستد تولید می کنند)، در آمیخته C، شش نمونه مثبت بود که سه نمونه آن DNA استخراج شده از خون، دو نمونه مربوط به DNA استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما و یک نمونه مربوط به DNA استخراج شده از پالپ پر بود؛ در آمیخته D شش نمونه مثبت شد که یک نمونه مربوط به DNA استخراج شده از خون، سه نمونه مربوط به DNA استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما و دو نمونه مربوط به DNA استخراج شده از پالپ پر بود؛ در آمیخته E پنج نمونه مثبت بود که چهار نمونه مربوط به DNA استخراج شده از پالپ پر و یک نمونه مربوط به DNA استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما بود؛ در



تصویر ۱- واکنش PCR نمونه DNA های استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما، خون و پالپ پر (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15) با استفاده از آغازگر Bar و Baf؛ DNA مارکر 50bp (Fermentas).

ابتدا کمیت DNA نمونه های مثبت با بیوفتومتر مشخص شد. هر نمونه محصول PCR بر اساس غلظت DNA در دو لوله به دو قسمت تقسیم شدند. سپس بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده آنزیمهای محدود کننده، به یکی آنزیم TaqI و به دیگری آنزیم DdeI اضافه شد. دستورالعمل به این نحو بود که به ازاء هر ۱ میکروگرم DNA، در مورد آنزیم TaqI، ۲/۵ میکرو لیتر بافر B و یک واحد آنزیم TaqI به نمونه اضافه شد و حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرو لیتر رسانده شد و به مدت ۲-۱/۵ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد گرما گذاری شد. در مورد آنزیم DdeI، ۲/۵ میکرو لیتر بافر H و یک واحد آنزیم DdeI به نمونه اضافه شد و حجم نهایی با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرو لیتر رسانده شد و به مدت ۲-۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرما گذاری شد.

الکترو فورز با ژل پلی آکریل آمید: الکترو فورز: ارزیابی و جستجوی DNA تکثیر شده در واکنش PCR، به کمک روش الکترو فورز با ژل پلی آکریل آمید و رنگ آمیزی با نیترات نقره، طبق دستورالعمل کتاب cloning molecular انجام گرفت. سپس باند روی ترانس الیمیناتور سفید مورد بررسی قرار گرفت و از آن عکسبرداری شد (۸).

### نتایج

#### واکنش PCR با جفت آغازگر Bar و Baf: واکنش PCR ۹۶ نمونه DNA

استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما، خون و پالپ پر با آغازگرهای Bar و Baf بغیر از شش نمونه همه دارای DNA جوجه قابل تکثیر بودند و در ۹۰ نمونه در الکترو فورز باند 401bp مشاهده گردید. بدین ترتیب ۹۰ نمونه DNA استخراج شده برای مطالعه مولکولی پرو ویروس J انتخاب شد، (تصویر ۱).

#### واکنش PCR با جفت آغازگر H5/H7: همه ۹۰ نمونه DNA استخراج

شده در کنار کنترل مثبت و کنترل منفی و مارکر انجام گرفت. علی رغم اینکه

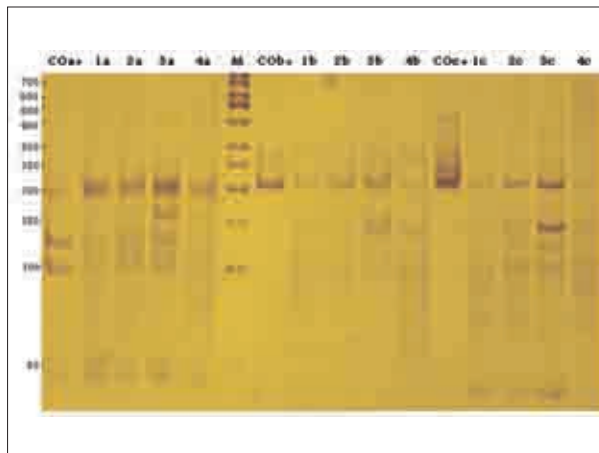


پرنندگان از جوجه‌های مادر گوشتی جدا و تحت نامهای HPRS-100 تا 104- HPRS نامگذاری شدند. جدایه‌های جدید به دلیل تفاوت در ارزیابی انترفرانس، ردیف میزبانی و تفاوت در پروتئین‌های غشای ویروس با سایر تحت گروهها، در تحت گروه جدیدی با عنوان تحت گروه J قرار گرفتند (۱،۵). با توجه به مطالعات انجام گرفته این مطالعه به جهت بررسی وضعیت J- ALV در گله‌های اجداد گوشتی ایران و ارزیابی بعضی از روشهای تشخیصی موجود در سطح فارم انجام گرفت.

تغییرات آنتی ژنیک و تشابه ردیفهای نوکلئوتیدی ویروسهای تحت گروه J با سایر گروههای آگروژن و آندوژن از یک طرف باعث کاهش حساسیت تکنیک PCR (۹،۱۵) و از طرف دیگر در صورت عدم دقت در طراحی آغازگرهای اختصاصی (۱۴) و انتخاب قسمت‌های از ژنوم که احتمال ایجاد تغییر وجود دارد (۱۲)، باعث افزایش نمونه‌های کاذب مثبت می‌شود؛ ولی با توجه باینکه با این تکنیک (در صورت اصلاح و مراقبت از آغازگرها و تست مرتب آنها)، می‌توان گله‌های اجداد و مادر گوشتی آلوده را قبل از انتقال عمودی شناسایی کرد (۱۱،۱۲)، کمک زیادی در کنترل بیماری می‌کند؛ برای افزایش حساسیت و ویژگی تکنیکهای مولکولی آغازگرهای متعددی از قسمت‌های مختلف ژنوم ویروس تحت گروه J، بخصوص از نواحی *pol*، *env*، *LTR* تهیه شده و مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است (۴،۱۱،۱۵). تشخیص جوجه‌های آلوده بلافاصله بعد از هچ با روشهای سریع، اختصاصی و حساس کمک زیادی در کنترل عفونت J-ALV می‌کند. مطالعات مقایسه‌ای زیادی (بصورت تجربی) در ارتباط با روش PCR، RT-PCR، جداسازی، ایمنوفلورسانس و خنثی سازی انجام گرفته است (۶،۱۱،۱۲،۱۴،۱۷). حساسیت بالای روش PCR در مقایسه با روش RT-PCR (۱۱)، همچنین عدم اختلاف آماری نتایج حاصل از PCR با نتایج حاصل از روش جداسازی در انتقال افقی و حتی در مواردی مناسب بودن روش PCR در مقایسه با روش جداسازی (۱۲)، موجب شده از آن به عنوان یک روش مناسب در تشخیص عفونت J-ALV استفاده شود. در تشخیص عفونت‌های ویرمیک موقت، روش PCR در مقایسه با روش‌های خنثی سازی یا جداسازی، بهتر است (۶).

در این مطالعه علی‌رغم بررسی نمونه‌های DNA با چندین آغازگر اختصاصی (۶،۱۲،۱۷) و استفاده از کنترل مثبت و کنترل منفی، تنها با روش nested-PCR، و به کمک آنزیم‌های محدود کننده نمونه‌های مثبت پروویروس تحت گروه J شناسایی شد.

با تاکید مجدد بر این نکته که آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR-nested، قادر به شناسایی کلیه رتروویروسهای آگروژن است و بر اساس مطالعه انجام شده توسط Garcia و همکاران در سال ۲۰۰۳، تکثیر DNA ویروسهای تحت گروه J، A، C، با آغازگرهای نستد، به طور مشترک باند حدود 210bp تولید می‌کنند و تکثیر DNA تحت گروه‌های D و B به ترتیب باندهای 175bp و 220bp تولید می‌کنند؛ تفریق تحت گروه‌های A، C، J برای رسیدن



تصویر ۳- الکتروفورز پلی آکریل آمید محصول nested-PCR که تحت تاثیر آنزیمهای محدود کننده قرار گرفته: نمونه‌های COa+, 1a, 2a, 3a, 4a تحت تاثیر آنزیم DdeI قرار گرفته؛ نمونه‌های COb+, 1b, 2b, 3b, 4b تحت تاثیر آنزیم TaqI قرار گرفته؛ و نمونه‌های COc+, 1c, 2c, 3c, 4c تحت تاثیر هیچ آنزیمی نبوده. CO+؛ کنترل مثبت (پلاسمید حامل پروویروس سویه HPRS-103). M؛ DNA مارکر (50bp) (Fermentas).

آمیخته A سه نمونه مثبت شد که یک نمونه مربوط به DNA استخراج شده از خون و دو نمونه مربوط به DNA استخراج شده از پالپ پر بود؛ و در آمیخته F دو نمونه مثبت شد که یک نمونه مربوط به DNA استخراج شده از پالپ پر و یک نمونه مربوط به DNA استخراج شده از مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما بود؛ در آمیخته B نمونه مثبت مشاهده نگردید.

در اکثر محصولات واکنش نستد مثبت علاوه بر باند 210bp باند حدود 160bp نیز داشتند، (تصویر ۲،۳). با توجه به اینکه آغازگرهای نستد ویژه همه ویروس‌های آگروژن است و با توجه به مطالعات قبلی (۶) احتمالاً باند مورد ذکر مربوط به تحت گروه D می‌باشد که البته نیاز به مطالعه بیشتر می‌باشد.

**آنالیز با آنزیمهای محدود کننده و الکتروفورز با پلی آکریل آمید ژل:** نتایج چهار نمونه آزمایش RLFP محصول nested PCR در تکنیک پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز در تصویر ۳ نمایش داده شده است. از ۲۲ نمونه مثبت محصول nested PCR، ۱۵ نمونه تحت تاثیر آنزیم‌های محدود کننده قرار گرفت، همه تحت تاثیر آنزیم DdeI همانند کنترل مثبت به دو قطعه 120bp و 90bp تقسیم شدند ولی تحت تاثیر آنزیم TaqI قرار نگرفتند، لذا باند 210bp مربوط به پروویروس J می‌باشد. به نظر می‌رسد باند حدود 160bp تحت تاثیر آنزیم TaqI قرار گرفته ولی بدلیل غلظت پایین آن قطعات حاصل قابل مشاهده نیست، از آنجا که باند مذکور تحت تاثیر آنزیم DdeI هضم نشده احتمالاً مربوط به تحت گروه D ویروسهای لکوز پرنندگان باشد.

## بحث

ظهور تحت گروه J ویروس لکوز پرنندگان (ALV-J) در پانزده سال پیش و تبدیل آن به مساله جهانی در کوتاه ترین زمان همراه با توانایی تغییرات آنتی ژنیک سریع، توجه محققان را جلب کرد (۱۵). در سال ۱۹۸۸ ضمن مطالعه وضعیت ویروسهای لکوز پرنندگان (ALVs) پنج جدایه جدید ویروس لکوز



مثبت تشکر و قدردانی می شود.

## References

- Bai, J., Howes, K., Payne, L. N., Skinner, M. A. (1995) Sequence of host-range determinants in the *env* gene of a full-length, infectious proviral clone of exogenous avian leukosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup (designated J). *J. Gen. Virol.* 76: 181-187.
- Bai, J., Payne, L. N., Skinner, M. A. (1995) HPRS-103(exogenous avian leukosis virus, subgroup J) has an *env* gene related to those of endogenous elements EAV-0 and E51 and an E element found previously only in sarcomaviruses. *J. Virol.* 69: 779-784.
- Cui, Z., Zhang, Y., Du, Z., Silva, R. F. (2003) Comparison of Chinese field strain of avian leucosis subgroup J viruses with prototype strain HPRS-103 and United States strains. *Avian. Dis.* 47: 1321-1330.
- Fadly, A. M. (2000) Isolation and identification of avian leukosis viruses: A review. *Avian. Pathol.* 29: 529-535.
- Fadly, A.M., Payne, L. N. (2003) Leukosis/ Sarcoma group in Saif, Y. M., J. H. Barns, C. W. Beard, L. R. Macdougald., *Disease of poultry.* 11<sup>th</sup> ed., Iowa state university press. Iowa, USA. pp.465-516.
- Garcia, M., Attrache, J.E., Riblet, S.M., Lunge, V. R., Fonseca, A. S. K., Villegas, P., Ikuta, N. (2003) Development and application of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction test for the detection of exogenous avian leukosis virus. *Avian. Dis.* 47: 41-53.
- Lupiani, B., Williams, S. M., Silva, R. F., Hunt, D., Henry, A., Fadly, A. M. (2003) Pathogenicity of Two Recombinant Avian Leukosis Viruses. *Avian Dis.* 47: 425-432.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001) Molecular cloning a laboratory Manual 3<sup>rd</sup> ed., CSHL press, New York. USA. 5.40-5.48, A9.6- A9.7.
- Silva, R. F., Fadly, A. M., Hunt, H. D. (2000) Hyper variability in the envelope genes of subgroup J avian leukosis viruses obtained from different farms in the United States. *Virol.* 272: 106-111.

به نتیجه قطعی ضروری است. برای این منظور محصول واکنش PCR-nested هر یک از نمونه‌های که حاوی قطعه 210bp بود، تحت تاثیر دو آنزیم DdeI و TaqI قرار گرفت، آزمایش پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز نشان داد قطعه 210bp همه نمونه‌ها متعلق به ویروس تحت گروه J می باشد. چون قطعه 210bp با آنزیم DdeI به دو قطعه 120bp و 90bp هضم شد ولی تحت تاثیر آنزیم TaqI قرار نگرفت (۶).

در مورد واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ویروس تحت گروه J پرندگان، با توجه باینکه تمام نمونه‌های مورد مطالعه در کنار کنترل مثبت و کنترل منفی انجام گرفته بود، بنابر این در واکنش PCR خطای کار وجود نداشت و دلایل منفی شدن نمونه‌ها با این آغازگرها می تواند حساسیت کم این آغازگرها در مقایسه با پرایمرهای نستد و تغییرات آنتی ژنیکی در پروویرسهای تحت گروه J در نمونه‌های مورد مطالعه باشد (۱۶، ۱۵، ۱۰، ۳). دو جفت آغازگر H5/H7 و H5/H7b حداکثر قادر به شناسایی ۲۴۰ کپی از پلاسمید نو ترکیب است (۱۲)، با توجه باینکه هر نمونه DNA استخراج شده در این مطالعه از مخلوط ۱۰ نمونه مخلوط سلولهای سفید خون و پلاسما، خون و یا پالپ پر بود، لذا ممکن است DNAهای آلوده به پروویروس به اندازه‌ای رقیق شده باشد که قابل شناسایی و اتصال با آغازگرهای مذکور نباشد. در مورد تغییرات آنتی ژنیکی، با توجه باینکه آغازگرهای مذکور به نواحی قابل تغییر (ژن *pol* و ژن *env*) متصل و باعث تکثیر قسمتی از آنها می شود (۱۳، ۱۵)، لذا ممکن است دلیل منفی شدن آزمایش PCR با این آغازگرها تغییرات آنتی ژنیکی در ناحیه اتصال آغازگرها باشد.

در مورد واکنش PCR نمونه‌های مورد آزمایش با آغازگرهای J5/J3 به خاطر آن که آغازگرهای مذکور همه ناحیه ژن *env* را تکثیر می کند و باند حدود 2125bp تولید می کند، ضمن اینکه دلایل فوق در مورد این آغازگرها نیز صادق است، چون آغازگر همه ناحیه *env* را تکثیر می کند لذا نیاز به DNA الگو با غلظت بالاتری می باشد (۹).

در مورد باند حدود 160bp چون با آنزیم DdeI هضم نشده (۶). با توجه باینکه این باند در نمونه‌های DNA استخراج شده از پالپ پر نیز مشاهده می شود و با توجه به آگاهی از این نکته که ویروس تحت گروه D بدلیل عدم تمایل به پالپ پر (۲) قاعدتاً نباید در نمونه‌های مذکور مشاهده شود، فلذا نیاز به بررسی بیشتری است.

نتایج نشان داد اکثر آمیخته‌های گوشتی موجود در ایران به ویروس تحت گروه J لکوز پرندگان آلوده است. همچنین مشخص شد با مخلوط کردن نمونه‌ها و استفاده از روش مولکولی حساس تر (nested-PCR) انجام مطالعه فارمی ویروس تحت گروه J لکوز پرندگان تسهیل می شود.

## تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به جهت تامین بودجه این مطالعه و از همکاری سازمان دامپزشکی کشور و تشکر و قدردانی می شود. همچنین از آقای دکتر Venugopal به خاطر ارسال نمونه کنترل



10. Smith, E. J., Fadly, A.M. (1979) An enzyme- linked immunosorbent assay for detecting avian leukosis-sarcoma virus. *Avian. Dis.* 23: 698- 707.
11. Smith, E. J., Williams, S. W., Fadly, A. M. (1998) Detection of avian leukosis virus subgroup J using the polymerase chain reaction. *Avian. Dis.* 42: 375-380.
12. Smith, L. M., Brown, S. R., Howes, K., McLeod, S., Arshad, S. S., Barron, G. S., Venugopal, K., McKay, J. C., Payne, L. N. (1998) Development and application of polymerase chain reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leukosis virus. *Virus Res.* 54: 87-98.
13. Spackman, E., Pope, C. R., Could, S.S., Rosenberger, J. K. (2003) The effects of avian leukosis virus subgroup J on broiler chicken performance to vaccination. *Avian. Dis.* 47: 618-626.
14. Spencer, J. L., Chan, M., Nadin-Davis, S. (2000) Relationship between egg size and subgroup J avian leukosis virus in eggs from broiler breeders. *Avian. Pathol.* 29: 617-622.
15. Venugopal, K. (1999) Avian leucosis virus subgroup J: a rapidly evolving group of oncogenic retroviruses, a review. *Res. Vet. Sci.* 67: 113-119.
16. Venugopal, K., Smith, L. M., Howes, K., Payne, L. N. (1998) Antigenic variants of J subgroup avian leukosis virus: sequence analysis reveals multiple changes in the env gene. *J. Gen. Virol.* 79: 757-766.
17. Zavala, G., Jack wood, M. W., Hilt, D. A. (2002) Polymerase chain reaction for detection of avian leucosis virus subgroup J in feather pulp. *Avian. Dis.* 46: 971-978.





# MOLECULAR STUDIES ON AVIAN LEUKOSIS VIRUS SUBGROUP J (ALV-J) INFECTIONS IN GRANDPARENT FLOCKS IN IRAN

Rajabi, Z., Bozorgmehrifard, M.H. \*, Peighambari, S.M.

*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

(Received 17 July 2007 , Accepted 11 March 2008)

---

## **Abstract:**

Subgroup J Avian Leukosis Virus (ALV-J) was isolated in the late 1980s from meat-type chickens in the United Kingdom. ALV-J with exception of some acute variants, cause myeloid leukosis in meat-type chickens with long incubation period. In this study while the status of Avian Leukosis Virus Subgroup J in six different strain of broiler grandparent flocks of Iran evaluated, the evaluation of different primers and some molecular methods also were done. For this reason, 100 blood samples, which had EDTA, 100 mixed of white blood cells and plasma and 100 feather pulps were collected from one farm of each broiler grandparent strain. PCR and nested PCR were methods that used for the study. In molecular study before the extraction of DNA from samples; In order to decrease the number of samples, 10 mixed of white blood cells and plasma, blood or feather pulp pooled. In molecular study with PCR all of samples were negative, but in nested PCR reaction, from six broiler strains, five strains infected to ALV-J. The results indicate that the most of broiler strains in Iran have been infected to ALV-J. The results also indicate that we can simply use pooled samples for the study of ALV-J in a flock by nested-PCR test.

**Key words:** broiler grandparent, ALV-J, PCR, nested-PCR.

\*Corresponding author's email: [mhbford@ut.ac.ir](mailto:mhbford@ut.ac.ir), Tel: 021-61117045, Fax: 021-66933222

