جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تعیین ردیف نوکلئوتیدی و قرابت فیلوژنتیکی ژن env ویروس نقص ایمنی گاو در ایران

حسن ممتاز[1*]، الهه تاج بخش[2]

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد-ایران.
۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد-ایران.
*نویسنده مسئول: hamomtaz@iaushk.ac.ir

دریافت مقاله: ۶مهر ۸۸ پذیرش نهایی ۲۴دی ۸۸

چکیده

ویروس نقص ایمنی گاو (BIV) از خانواده رتروویریده و جنس لنتی ویروس واجد ۳ ژن ساختمانی اصلی gag, pol,env می‌باشد. به منظور تعیین قرابت فیلوژنی ژن env ویروس BIV در نمونه‌های آلوده به این ویروس در ایران در ابتدا قطعه ۴۹۰ جفت بازی ژن env از ۵ نمونه آلوده در سیستم PCR تکثیر و جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی سکانس گردید. نتایج حاصل از مقایسه ردیف نوکلئوتیدی تعیین شده در این مطالعه با سکانس شناخته شده ژن env ویروس BIV 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 env در امریکا (سکانس U80941) با ۹۹/۴ درصد تشابه و بیشترین تفاوت مربوط به جدایه این ویروس در ژاپن (سکانس AB040423) با ۷۰/۱ درصد قرابت مشاهده شد. پژوهشنامه دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶، شماره ۱، ۴۸-۴۵.

واژه‌های کلیدی: ویروس نقص ایمنی گاو، ژن env، قرابت فیلوژنتیکی، ایران.

Sequencing and phylogenetic analysis of Bovine Immunodeficiency Virus env gene in Iran

Momtaz, H.[1*], Tajbakhsh, E.[2]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord-Iran.*

[2]*Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord-Iran.*

Abstract

Bovine Immunodeficiency Virus (BIV) belongs to the genus Lentivirus of the family Retroviridae comprising 3 main structural genes of gag, pol and env. For determination of genetic relationship of env gene of BIV in Iran with those in other countries firstly fragments 490 bp corresponding to env from 5 samples amplified in PCR system and was sequenced for determining nucleotide sequence and was compared with identified nucleotide sequence of this gene in other countries.A comparison made on env gene in Iran with other countries show 0.6 to 29.9% variability in env gene, of which the greatest sequence similarity exists between sequences of env in Iran with USA (U80941)with 99.4% similarity and the least relationship exists between sequences of this virus in Iran with Japan (AB040423) with 70.1% similarity. ***Vet. Res. Bull. 6,1: 45-48,2010.***

Keywords: Bovine Immunodeficiency Virus, env gene, Phylogenetic relationship, Iran.

مقدمه

ویروس نقص ایمنی گاو Bovine Immunodeficiency Virus (BIV)، ویروسی از خانواده رتروویریده و جنس لنتی ویروس است که ویریون بالغ آن ۱۳۰-۱۲۰ نانومتر قطر دارد (۳و۸و۱۰).

لنتی ویروس‌ها گروه بزرگی از ویروس‌های اگزوژن غیرانکوژن می‌باشند که در بر گیرنده ویروس‌هایی نظیر Vizna-Maed در گوسفند، ویروس کم خونی عفونی اسب (EIAV)، ویروس نقص ایمنی گاو، ویروس نقص ایمنی گربه (FIV)، ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) و Jambrana disease virus می‌باشند. این ویروس‌ها از لحاظ خصوصیات بیولوژیک و پاتولوژیک بسیار شبیه هم می‌باشند به طوری که واکنش متقاطع آنتی ژنیک بین لنتی ویروس‌های مختلف گزارش شده است (۶و۹).

ویروس BIV باعث اختلال در عملکرد منوسیت‌ها و ماکروفاژها می‌گردد اما در بسیاری از موارد علایم کلینیکی تظاهر نمی‌کند و گاو مبتلا به یک عفونت غیر شکار می‌گردد. بر خلاف ویروس‌های HIV, FIV که باعث کاهش میزان زیاد تعداد لنفوسیت‌های TCD+4 می‌گردند در گاوهای آلوده به BIV کاهش چشمگیر لنفوسیت‌های TCD+4 مشاهده نمی‌شود (۱و۳و۱۱). ژنوم این ویروس مشابه رتروویروس‌های دیگر از دو کپی مولکول RNA مثبت تشکیل شده که سه ژن ساختمانی اصلی به نام gag, pol, env را کد می‌کند(). ژن env کد کننده دو پروتئین سطحی TM(gp42), Su (gp110) می‌باشد که در اتصال ویروس به گیرنده‌های سطح سلول و در نهایت در ورود ویروس به درون

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۱ـ پرایمر های مورد استفاده جهت آنالیز ژن env ویروس BIV.

نام پرایمر	توالی پرایمر ('3-5')	اندازه محصول (bp)	سکانس دسترسی
BIV-env-F	GGAATTCGGGTGCTTGCAGGAATGC	490	U80944
BIV-env-R	GCAGTCGACGAGTTGCCGCGTCTCATG		

سلول میزبان موثر می‌باشند. پادتن‌های ایجاد شده علیه پروتئین‌های p26, gp110(از دسته پروتئین‌های gag) از اهداف بسیار مهم جهت تشخیص عفونت با BIV می‌باشند(۲و۵و۱۲).

در این مطالعه علاوه بر ردیابی ژن env ویروس BIV در بافی کوت گاوهای به ظاهر سالم و تعیین ردیف نوکلئوتیدی این ژن در ایران، قرابت ژنتیکی ژن env در نمونه‌های ایران با سایر کشورها مقایسه شده است.

مواد و روش کار

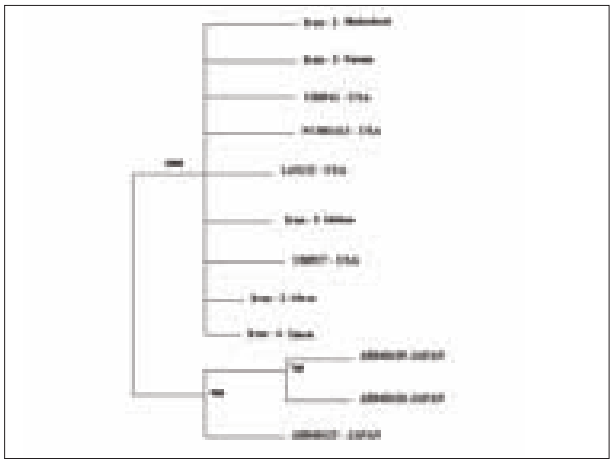
جهت انجام این تحقیق تعداد ۱۰۰ نمونه خون کامل واجد ماده ضد انعقاد EDTA به حجم ۱۰ میلی لیتر از گاوهای مسن تر از ۱ سال از استان‌های چهارمحال و بختیاری (شهرستان‌های شهرکرد و فارسان)، اصفهان(شهرستان‌های اصفهان و گلپایگان)، آذربایجان شرقی(شهرستان تبریز) و خوزستان(شهرستان اهواز) اخذ گردید و پس از جداکردن لایه بافی کوت (لایه گلبول‌های سفید خون) از هر نمونه جهت تخلیص DNA از آن‌ها از روش فنل ـ کلروفرم استفاده شد(۷).

جهت تکثیر ژن env ویروس BIV در DNA تخلیص شده از نمونه‌های مورد مطالعه از زوج پرایمرهای نشان داده شده در جدول ۱ که بر اساس سکانس ژن env ویروس ثبت شده در بانک ژنی توسط برنامه Primer Design در سایت WWW.Invitrogen.com طراحی شد استفاده گردید:

جهت انجام آزمایش PCR و تکثیر قطعه ژنی env از دستگاه Master cycler gradient (Eppendorf Germany Co.) با حجم ۵۰ میکرو لیتر واجد ۵ میکرو لیتر PCR buffer 10x، ۲ میلی مولار Mgcl2، ۲۰۰ میکرو مولار dNTP، ۱ میکرو مولار از زوج پرایمرهای BIV-env-F و BIV-env-R، ۱ واحد آنزیم ۱ واحدی Polymerase Tag DNA (Roche applied science) و ۱ میکرو گرم از DNA هر نمونه استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از:

یک سیکل ۹۴ درجه ۶ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۸ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۵۰ ثانیه و سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۸ دقیقه.

جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی محصول PCR مربوط به ۵ نمونه از نمونه‌های مثبت شده در آزمایش PCR جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی قطعهٔ تکثیر یافته در PCR به شرکت Macrogen کره ارسال و با استفاده از دستگاه ABI 3730 XL و روش Sanger Sequencing سکانس گردید. نمونه‌های سکانس شده در این مطالعه با سکانس ژن env ویروس BIV در سایر کشورها (ثبت شده در بانک ژنی NCBI شامل سکانس‌های L43132, U80937, AB040429, AB040426, AB040423 U80941, Nc001413,) با استفاده از نرم افزار Clustal X(1.81) و Njplot مقایسه و ضمن تعیین Sequence identity matrix، درخت فیلوژنی مربوطه رسم شد.



شکل ۱ـ درخت فیلوژنتیکی مربوط به ردیف نوکلئوتیدی ژن env ویروس BIV در ایران با تعدادی از سکانس های ثبت شده این ژن در بانک ژنی.

نتایج

از جمع ۱۰۰ نمونه مورد مطالعه تعداد ۳۶ نمونه واجد قطعه ۴۹۰ جفت بازی DNA مربوط به پرووویروس BIV بودند که ردیف نوکلئوتیدی ژن env ویروس BIV مربوط به ۵ نمونه از نمونه‌های مثبت شده در آزمایش PCR سکانس و با استفاده از نرم افزار X Clustal با ردیف نوکلئوتیدی این ژن ثبت شده در بانک ژنی (NCBI Alignment) گردید و پس از مقایسه شباهت‌ها و تفاوت‌های ردیف نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار Njplot قرابت فیلوژنتیکی آن‌ها ترسیم شد که درخت فیلوژنی حاصله در شکل ۱ و میزان قرابت بین ژن env ویروس BIV در ایران با سایر کشورها در جدول ۲ نشان داده شده است:

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول۲: نتایج حاصل از مقایسه ردیف نوکلئوتیدی ژن env ویروس BIV در ایران با تعدادی از سکانس های ثبت شده این ژن در بانک ژنی .(Sequence Identity Matrix).

env gene seq	hahrekord Iran-1 S	-2 Ahvaz Iran	-3 Farsan Iran	-4 Tabriz Iran	-5 Isfahan Iran	USA U80941	USA U80937	USA C001413 N	USA L43132	Japan B040429 A	Japan B040426 A	Japan B040423 A
Iran-1- Shahrekord	ID	0.936	0.928	0.914	0.908	0.994	0.991	0.989	0.908	0.716	0.717	0.712
Iran-2- Ahvaz	0.936	ID	0.912	0.916	0.921	0.991	0.990	0.990	0.928	0.718	0.710	0.708
Iran-3- Farsan	0.928	0.912	ID	0.907	0.923	0.989	0.987	0.989	0.921	0.742	0.740	0.736
Iran-4- Tabriz	0.914	0.916	0.907	ID	0.911	0.990	0.985	0.986	0.931	0.704	0.706	0.702
Iran-5- Isfahan	0.908	0.921	0.923	0.911	ID	0.988	0.984	0.986	0.904	0.706	0.703	0.701
U80941- USA	0.994	0.991	0.989	0.990	0.988	ID	0.989	0.991	0.986	0.732	0.728	0.721
U80937- USA	0.991	0.990	0.987	0.985	0.984	0.989	ID	0.990	0.987	0.743	0.738	0.736
NC001413- USA	0.989	0.990	0.989	0.986	0.986	0.991	0.990	ID	0.991	0.736	0.733	0.731
L43132- USA	0.908	0.928	0.921	0.931	0.904	0.986	0.987	0.991	ID	0.710	0.708	0.703
AB040429- Japan	0.716	0.718	0.742	0.704	0.706	0.732	0.743	0.736	0.710	ID	0.709	0.701
AB040426- Japan	0.717	0.710	0.740	0.706	0.703	0.728	0.738	0.733	0.708	0.702	ID	0.691
AB040423- Japan	0.712	0.708	0.736	0.702	0.701	0.721	0.736	0.731	0.703	0.706	0.704	ID

بحث و نتیجه‌گیری

در بین ژن‌های ساختمانی ویروس BIVژن‌های gag وpol و env ازجمله ژن‌های نسبتا حفاظت شده هستند که تنوع ژنی در بین آن‌ها کمتر دیده شده و به واسطه همین خصلت طبیعی امروزه از روش‌های تشخیص بیولوژی مولکولی برپایه PCR، کلونینگ و... با استفاده از ردیابی پرووویروس BIV و یا ژن‌های ساختمانی مذکور طراحی شده‌اند(۴و۹و۱۲). مطالعه حاضر با هدف ردیابی ژن env ویروس BIV، تعیین ردیف نوکلئوتیدی این ژن و بررسی تنوع ژنتیکی آن انجام گرفت و همان گونه که در قسمت نتایج ذکر شد یکی از اهداف اصلی این بررسی یعنی ردیابی ژن env در نمونه‌های آلوده به BIV برای اولین بار در ایران به تحقق پیوست و وجود ژن مذکور با توسل به روش تعیین ردیف نوکلئوتیدی (Sequencing) قطعه مربوطه مورد تایید قرار گرفت. تعیین ردیف نوکلئوتیدی قطعه ۴۹۰ جفت بازی تکثیر یافته در PCR در تقریبا ۴۰۰ نوکلئوتید از ۵ نمونه سکانس شده انجام گرفت.

در قسمت دیگر این تحقیق به منظور تایید ردیف نوکلئوتیدی ژن env و مقایسه تنوع ژنتیکی این ژن در نمونه‌های ایران با سایر ویروس‌های موجود در دنیا اقدام به مقایسه ردیف نوکلئوتیدی تعیین شده این ژن در ایران با تعدادی از سکانس‌های شناخته شده این ژن در بانک ژنی NCBI گردید. مقایسه ردیف‌های ژنی حاکی از وجود ۶/۴ تا ۹/۳ درصد تنوع در ۵ نمونه سکانس شده در ایران و ۰/۶ تا ۲۹/۹ درصد تنوع بین نمونه‌های ایران با سایر کشورها بود (جدول۱) که در این میان بیشترین قرابت مربوط به سکانس شناخته شده این ژن در آمریکا (سکانس U80941) با ۹۹/۴ درصد قرابت و بیشترین تفاوت مربوط به جدایه این ویروس در ژاپن (سکانس AB040423) با ۷۰/۱ در صد قرابت مشاهده شد. با استفاده از نرم افزار Clustal X و Njplot درخت فیلوژنیک ردیف‌های ژنی مقایسه شده ترسیم گردید و همان گونه که در شکل (۱) مشاهده می‌شود سویه‌های ایران در شاخه سکانس آمریکا قرار دارد و تفاوت معنی داری را با سکانس شناخته شده ژن env در ژاپن نشان می‌دهند.

مشاهده تنوع نه چندان چشمگیر ردیف ژنتیکی ژن env ویروس BIV را می‌توان براساس گسترش جغرافیایی ویروس توجیه نمود. با توجه به این که منشاءبسیاری از گاوهای اصیل موجود در گاوداری‌های ایران به کشورهای آمریکایی باز می‌گردد. لذا شباهت ژنتیکی حاصله در این تحقیق نیز می‌تواند موید این ادعا باشد. از طرفی نقل و انتقال دام بین کشورهای شرق دور (ژاپن) با ایران سابقه تاریخی ندارد لذا استقرار سویه‌های ژاپنی ویروس در شاخه دیگر درخت فیلوژنی نشانگر تفاوت بیشتر ردیف ژنی env این ویروس بین ایران با ژاپن می‌باشد.

References

1- Carpenter, S., Vaughn, E.M., Yang, J., Baccam, P., Roth, J.A. (2000) Antigenic and genetic stability of Bovine Immunodeficiency virus during long-term persistence in cattle experimentally infectied with the BIVR2, isolated. *Journal of General Virology*, **81**: 1463- 1472.

2- Claude, M., Louis, S.T., Cojocariu, M., Archambaut, D. (2004)The Molecular biology of Bovine Immunodeficiency Virus: a comparison with other lentiviruses. *Animal Health Research Reviews*, **5**:20125-143.

3- Flaming, K., Van Der Maaten, M.Y., Whetstone, C., Carpenter, S., Frank, J., Rooth. Y. (1993) Effect of bovine immunodeficiency - Like virus infection on immune. Function in experimentally infected. *Veterinary Immunology and Pathology*, **36**:91-105.

4- Gradil, C.M., Watson, R.E., Renshaw, Gibert, R.O., Dubovi, E. J. (1999) Detection of Bovine Immunodeficiency Virus DNA in the blood and serum of experimentally infected bulls.*Veterinary Microbiology*, **70**:21-23.

5- Gonda, M., Braun, M.J., Carter, S.J., Kost, T.A., Arthur, L.D., Moaten, M.Y. (1987)Charactarization and Molecular cloning of a bovine Lentivino related to Human Immunodoficiency virus. *Nature*, **330**:388-391.

6- Horzinek, M.,Keldermans, L., Stuurman, T., Black, J., Herrewegh, A., Sillekens, P., Koolen, M. (1991) Bovine Immunodeficiency Virus: Immunochemical characterization and serological survey. *Journal of General Virology*, **72**:2923-8.

7- Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R., Berns, A. (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research*, **19**:4293.

8- Narayan, O., Clements, J. (1989) Biology and pathogenesis of Lentiviruses. *Journal of General Virology*, **70**:1617-1639.

9- Patill, S.S., Pattna, K.B., Mishra, N., Banumathi, N., Dubey, R., Pradhan, H.K. (2003) Detection of proviral genomic sequence of Bovine Immunodeficiency Virus in Indian cattle. *Current Science*, **84**:563-566.

10- Sinder, T.G., Hoyt, P.G., Coats, K.S., Graves, K.F., Cooper, C.R., Storts, R.W., Luther, D.G., Jenny, B.F. (2003) Natural bovine lentiviral type 1 infection in Holestein dairy cattle. clnical, serological and pathological observation. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Disease, **26**:89-101.

11-Yilmaz, Z., Yesilbag, K. (2008) Clinical and Haematological findings in bovine Immumdeficiency Virus (BIV) Infecteed cattle. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science, **32**:207- 214.

12-Zhang, S.H., Xue. W., Wood, C.H., Chen, Q.I., Kapil, S., Minocha, H.C. (1997) Detection of Bovine Immunodeficieney Virus antibodies in Cattle by western blot assay with recombhinant gag protein. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, **9**:347-351.