

شناسایی ژن F ویروس بیماری نیوکاسل جدا شده از اپیدمی های اخیر بیماری در ایران

سارا صمدی¹، مهدی کیانی زاده²، محسن فتحی نجفی²، سید داوود موسوی نسب³، امیرمحمد حسین نیا دواتگر⁴، مهري جعفری⁵، نایبعلی احمدی^{6*}، رضا عزیزیان⁷

(1) مرکز تحقیقات کاربردی سلامت همگانی و توسعه پایدار، دانشگاه علوم پزشکی فراسان شمالی بجنورد

(2) موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد

(3) دپارتمان ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

(4) دپارتمان کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(5) دانشگاه علوم پزشکی فراسان شمالی بجنورد

(6) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

(7) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

تاریخ پذیرش: 91/10/28

تاریخ دریافت: 91/5/25

چکیده

مقدمه: بیماری نیوکاسل عفونتی فوق العاده مسری در بسیاری از گونه های طیور می باشد. ویروس بیماری نیوکاسل متعلق به خانواده پارامایکسوویریده و جنس رابولوویریده است. از پوشش این ویروس دو نوع زائده سطحی (خار) خارج شده است که یکی از آن ها گلیکوپروتئین امتزاجی (F) است و مسئول امتزاج سلولی، همولیز و نفوذ ویروس است. شکست پذیری مولکول FO با خاصیت بیماری زایی ویروس ها در درون طیور ارتباط مستقیم دارد. هدف از این مطالعه شناسایی ژن F ویروس بیماری نیوکاسل و تعیین توالی های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی سویه های جدا شده از اپیدمی های اخیر بیماری در ایران است.

مواد و روش ها: ویروس ها (شش سویه) پاساژ داده شد و RNA آن ها استخراج گردید. سپس cDNA با استفاده از روش RT-PCR تهیه و تکثیر ژنوم ویروس انجام گردید. ایزوله ها از طریق الکتروفورز و مشاهده باندها توسط UV شناسایی شدند. بر روی نمونه ها واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم Pst I انجام گردید. برای تایید نتایج تعدادی از نمونه ها برای تعیین ترادف (سکوئینسینگ) ارسال گردید.

یافته های پژوهش: کلیه نمونه ها باند 935 bp نشان دادند که پس از هضم آنزیمی با PstI دو باند 720bp و 180 bp به دست آمد. آنالیز نوکلئوتیدی تفاوت قابل توجهی در توالی اسیدآمینه را نشان نداد و هیچ تغییر اسیدآمینه ای در جایگاه شکست پروتئین F مشاهده نشد.

بحث و نتیجه گیری: عدم وجود هیچ گونه جهش نقطه در جایگاه شکست پروتئین F، نشان دهنده اهمیت حفظ شدگی شدید ناحیه جایگاه شکست در بین سویه های مختلف مورد مطالعه می باشد.

واژه های کلیدی: ویروس نیوکاسل، شناسایی ژن F، موتاسیون، ایران

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

Email: nayebalia@yahoo.com, Nayebalia@sbbmu.ac.ir

مقدمه

بیماری نیوکاسل عفونتی فوق العاده مسری در بسیاری از گونه های طیور می باشد برای اولین بار در سال 1926 در جاوه مشاهده گردید. این ویروس در پائیز همان سال به انگلستان راه یافت و در منطقه ای به نام نیوکاسل تشخیص داده شد و بعدها بیماری فوق در بسیاری از نقاط دنیا نیز مشاهده گردید، (1-3). تاریخچه بیماری نیوکاسل توسط حداقل سه Panzootic در پرندگان اهلی مشخص شده است. اولین آن ها با ظهور این بیماری در اواسط دهه 1920 در پرندگان آغاز شد و به طور آهسته از خاور دور به سراسر دنیا (با انتشار خیلی سریع درون برخی کشورها) گسترش یافت. دومین panzootic در اواخر دهه 1960 در خاورمیانه آشکار شد و با انتشار خیلی سریع تر از اولی در سال 1973 تقریباً تمام کشورها را فرا گرفت، (4). سومین panzootic در ارتباط با بیماری ایجاد شده در کبوترها با گرایش به بافت های عصبی گزارش گردید. این رویداد در کشورهای خاورمیانه و در اواخر دهه 1970 و اواسط دهه 1980 در کبوترهای مسابقه ای، نمایشی، گوشتخوار و شکاری در تمام دنیا گسترش یافت و در برخی کشورها انتشار این بیماری به سایر پرندگان و طیور نیز گزارش شده است، (4-6). اولین panzootic بیماری نیوکاسل به حدود زمان شروع جنگ جهانی دوم باز می گردد. آنالیز ژنتیکی سویه های NDV جدا شده قبل از دهه 1960 نشان دهنده وجود حداقل سه تبار ژنتیکی می باشد (ژنوتیپ II-IV). از میان این ژنوتیپ ها، ژنوتیپ IV نقش مهمی در همه گیری بیماری نیوکاسل قبل از دهه 1970 بر عهده داشته و در اواخر دهه 1970 به صورت پراکنده و اندک، مجدداً ظهور یافته است. ویروس های ژنوتیپ V مسئول ایجاد همه گیری مهم سال 1970 بوده اند، طبق بررسی ها و مطالعات انجام شده می توان گفت که ژنوتیپ V از ژنوتیپ های II-IV قبل از دهه 1970 اشتقاق یافته اند، (3). مطالعات نشان داده است که فراوانی ویروس های ژنوتیپ IV قبل از دهه 1970 بسیار زیاد بوده اما پس از آن چندین ژنوتیپ دیگر (IV-VIIa, VIIb) در وقوع همه گیری ها دخالت داشته اند. موارد بیماری نیوکاسل گزارش شده

بین سال های 1993-1995 به وسیله ژنوتیپ اندمیک در غرب چین (VIIa) به وجود آمده است. ژنوتیپ VIII نیز طی سال های 1996-1999 مسئول همه گیری بسیار گسترده در آفریقای جنوبی و سپس در چین بوده است، (۴،۵). ویروس بیماری نیوکاسلیک RNA ویروس متعلق به جنس پارامیکسوویروس و خانواده پارامیکسوویریده می باشد. در میان پارامیکزو ویروس های طیور، 9 سروتیپ مجزا از APMV-1 تا APMV-9 شناسایی شده است و NDV سروتیپ APMV-1 می باشد، (۶،۷). از پوشش این ویروس دو نوع زائده سطحی (خار) خارج شده است. یکی از آن ها پروتئین گلیکوزیله ای است که شامل همگلوپروتئین (H) و نورامینیداز (N) ویریون (گلیکوپروتئین HN) می باشد و دیگری از گلیکوپروتئین امتزاجی (F) تشکیل یافته که مسئول امتزاج سلولی، همولیز و نفوذ ویروس است، (8-10). پارامیکسوویروس ها نظیر NDV گروهی از ویروس های پوشش دار هستند که در PH خنثی با غشای پلاسمایی سلول ها امتزاج می یابند. از آن جایی که این امتزاج در PH خنثی صورت می گیرد، سلول های آلوده با این ویروس ها قادرند با سلول های مجاور خود امتزاج یافته و در نتیجه سلول های چند هسته ای و بزرگ یا سنسیویم ها را به وجود آورند. جهت انجام فرآیند امتزاج، پروتئین پیش ساز FO می بایست در محل آمینواسیدهای موقعیت 116 از انتهای آمینی شکسته شده و منجر به ایجاد F1 و F2 با اتصال دی سولفیدی گردد، (11-14). پروتئین F ویروسی عمل امتزاج بین غشاء ویروس و غشاء سلول میزبان را انجام می دهد و در نتیجه ژنوم ویروسی به درون سلول وارد شده و همانند سازی آن آغاز می گردد، (15). بنا بر این می توان گفت که پروتئین امتزاجی جهت انجام همانندسازی ضروری است، اما در طول همانندسازی ابتدا پیشساز گلیکوپروتئینی FO ساخته می شود که به دو پلی پپتید F1 و F2 شکسته شده و به وسیله پل های دی سولفیدی بهم متصل باقی می ماند. این شکست بعد از ترجمه و توسط پروتئازهای سلول میزبان انجام می پذیرد. شکست پذیری مولکول FO با خاصیت بیماری زایی ویروس ها در درون طیور ارتباط مستقیم

این ویروس های ولونژیک گردیده است. هدف از این مطالعه شناسایی ژن F ویروس بیماری نیوکاسل و تعیین توالی های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی سویه های جدا شده از اپیدمی های اخیر بیماری در ایران است.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه

نمونه های ویروسی مورد نظر شامل ویروس های KND/20 (قزوین)، KND/30 (کرمانشاه)، KND/35 (خوزستان)، KND/40 (کرج) و KND/45 (نیشابور) می باشند. این تعداد سویه ویروس از شیوع NDV طی سال های 1375 تا 1378 از گونه های متفاوت طیور در نقاط مختلف کشور به دست آمده و در موسسه سرم سازی رازی نگهداری می شود و به صورت تنها بانک ویروسی در دسترس به کار گرفته شد.

پاساژ ویروس

جهت پاساژ هر ویروس 2-3 عدد تخم مرغ جنین دار 9 روزه عاری از عوامل بیماری زا استفاده گردید. ویروس ها را به کمک نرمال سالین و یا فسفات بافرسالین (PBS) به نسبت 1 به 10 رقیق کرده، سپس حدود 2cc محلول حاوی ویروس به تخم مرغ های جنین دار عاری از عوامل بیماری زا تزریق گردید. تخم مرغ ها درون انکوباتور در دمای 37 درجه قرار داده شد و پس از 24 ساعت تخم مرغ واجد جنین های تلف شده حذف و بقیه تخم مرغ ها به درون انکوباتور با دمای 37 درجه سانتی گراد انتقال یافت. پس از 48 ساعت مایع آلانتوئیک حاوی ویروس به کمک سرنگ از تخم مرغ ها برداشت گردید.

تعیین پرایمر مناسب جهت تولید cDNA

در این مطالعه از هر دو نوع پرایمر اختصاصی و غیراختصاصی استفاده گردید. اما به دلیل بهتر بودن باندهای تشکیل شده توسط پرایمرهای غیراختصاصی در این مرحله از این نوع پرایمرها استفاده شد.

طراحی پرایمر اختصاصی

پرایمر با استفاده از رفرانس های GenBank طراحی گردید. (جدول شماره 1) پرایمر KF200F به عنوان پرایمر Forward و در موقعیت

دارد، (16-18). مطالعات انجام شده بر روی نتایج توالی آمینواسیدی محل شکست پروتئین امتزاجی در سویه های بیماری زا نشان می دهد که در این مکان آمینواسیدهای جفت بازی وجود دارند. حضور آمینواسیدهای بازی در این محل بدین معنی است که ایجاد شکست تحت تأثیر وجود پروتئاز یا پروتئازها در تعداد زیادی از بافت ها و اندام های میزبان می باشد، (۱۹،۲۰). بیماری نیوکاسل از نظر حدت ویروس عامل بیماری و قابلیت انتقال آن در میان طیور به اشکال مختلف بروز می کند. در برخی موارد گسترش بیماری که مخصوصاً در جوجه های بالغ دیده می شود، علایم بالینی بسیار محدود دارد اما در موارد دیگر که بیشتر در طیور جوان به چشم می خورد، میزان مرگ و میر بیماری به 25 درصد می رسد. قابلیت شکافته شدن پروتئین امتزاجی مهم ترین عامل مؤثر در حدت ویروس می باشد. بیماری حاد همراه با علائمی نظیر اختلال در سیستم گردش خون، اسهال شدید و درگیری دستگاه عصبی مرکزی است. مرگ و میر زیاد طیور در اثر آلودگی به ویروس های مولد نوع حاد بیماری و نیز افت تولید و کاهش وزن در مبتلایان بهبود یافته خسارات اقتصادی بسیاری را ایجاد کرده است، (21). در ایران بیماری نیوکاسل برای اولین بار در سال 1329 به طور دقیق و آزمایشگاهی تشخیص داده شد. اولین کانون آلودگی از شهرستان تبریز گزارش گردید و کارشناسان موسسه رازی ابتدا به وسیله تزریق به جوجه های حساس و سپس با کشت ویروس در تخم مرغ جنین دار موفق به جدا ساختن ویروس بیماری نیوکاسل و شناسایی آن گردیدند. این زمان مصادف با توسعه روزافزون صنعت مرغداری در ایران بود. از این رو بیماری طی مدت کوتاهی در سایر استان های کشور شیوع یافت و به خوبی در ایران مستقر گردید. به طوری که از آن هنگام تاکنون این بیماری یکی از مهم ترین آفات مرغداری های کشور ما به شمار می آید. با توجه به اهمیت ویروس های NDV ولونژیک در کشورهای مختلف و کاربرد گسترده واکسن بر علیه این ویروس ها، در ایران نیز این امر مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است و در این راستا اقدام به شناسایی و تولید واکسن بر علیه

نوکلئوتیدی 943-962 با طول 20 نوکلئوتید
قرار دارد. پرایمر KF200R به عنوان پرایمر
Reverse در موقعیت نوکلئوتیدی 1732-1713
نیز به طول 20 نوکلئوتید می باشد.

جدول شماره 1. پرایمرهای مورد استفاده در آزمایش PCR

Primer	Sequence
KF200F	5'-TGCCACCTACTTGGAGACCT-3'
KF200R	5'-GATACCTCCGCCTCTCATCT-3'

محاسبه شده و به صورت 4 دقیقه دمای 95 درجه سانتی گراد، 1 دقیقه دمای 94 درجه سانتی گراد، 1 دقیقه دمای 58 درجه سانتی گراد، 1 دقیقه دمای 72 درجه سانتی گراد، و در پایان 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی گراد انجام گردید.

الکتروفورز

نمونه های حاصل از PCR بر روی ژل آگارز 1/2 درصد حاوی بافر 0/5 TBEX الکتروفورز گردید. رنگ آمیزی ژل نیز به کمک اتیدیوم بروماید و درون ژل انجام گرفت. جهت قراردادن نمونه های حاصل از PCR به درون چاهک های ژل از بافر نمونه گذاری 6X استفاده شد و پس از پایان الکتروفورز، باند مورد نظر به کمک دستگاه UV مشاهده گردید.

هضم با آنزیم محدود کننده *PstI*

پس از بررسی ترتیب ژن امتزاجی ویروس بیماری نیوکاسل در پایگاه ژنی و با بررسی آنزیمی آن توسط سایت NEB Cutter بهترین آنزیم در موقعیت مناسب محصول PCR شناسایی و جهت تایید محصول PCR تولید شده مورد استفاده قرار گرفت. (جدول شماره 2)

واکنش RT

جهت تهیه cDNA نسبت مواد مورد نیاز با هم مخلوط و در ترموسایکلر جهت انجام واکنش قرار داده شد، این نسبت های طراحی شده مواد مورد نیاز عبارتند از: (1X) از 6 μ l از RT Buffer MULV، (4/5 mM) از 1/5 μ l از dNTP، (3pm) از 1 μ l از Random Primer، (0/37U/ μ l) از 0/5 μ l از RNAase inhibitor، (0/075U/ μ l) از 0/5 μ l از MULV، 5 μ l از RNA و 15/5 μ l از RNAase free Water.

پرایمر استفاده شده جهت تولید cDNA با توالی راندوم هگزامر به صورت 5'AGCAAAAGCAGG3' از شرکت MWG آلمان تهیه گردید.

واکنش PCR

واکنش PCR نیز پس از بهینه سازی به صورت (3X) از 3 μ l از PCR Buffer، (300 μ M) از 1 μ l از dNTP، (3U/ μ l) از 0/5 μ l از Taq polymerase، (15ng) از 5 μ l از cDNA، (3+3pm) از 1+1 μ l از Specific Primer و 18/5 μ l آب انجام شد. سیکل حرارتی PCR با توجه به نوع پرایمر و T_m و T_a

جدول شماره 2. هضم با آنزیم محدود کننده *PstI*

PstI Buffer(10X)	2 μ l(1X)
PstI (10U/ μ l)	0/5 μ l(1U/ Reaction)
PCR Product	5 μ l
DEPC Water	12 μ l
Total	20 μ l

PCR به دست آید، این محصولات پس از بررسی و تایید با الکتروفورز جهت خالص سازی نهایی استفاده گردید.

تهیه محصول PCR جهت توالی یابی

برای این قسمت واکنش های PCR در حجم 100 μ l تهیه شد تا حجم نهایی بیشتری از محصول

Purification (شرکت Roche آلمان) انجام شد و جهت توالی یابی به کشور آلمان ارسال گردید. (جدول شماره 3)

خالص سازی محصول PCR
خالص سازی مستقیم DNA از محصول PCR
به کمک کیت High Pure PCR Product

جدول شماره 3. سویه های مورد مطالعه ثبت شده در Gen Bank

Strain	Accession No	Source
MK13/75	AY928933	Gen Bank
KND/20	AY928934	Gen Bank
KND/30	AY928935	Gen Bank
KND/35	AY928936	Gen Bank
KND/40	AY928937	Gen Bank
KND/45	AY928938	Gen Bank

یافته های پژوهش

پاساژ ویروس و تست HI

پس از گذشت 24 ساعت، پاساژ ویروس ها در برخی از جنین های موجود در تخم مرغ ها ضایعات خونریزی بسیار زیادی مشاهده گردید که سبب از بین رفتن جنین ها و حذف آن ها شده بود. پس از طی 48 ساعت و برداشت مایع آلتوتوئیک از تخم مرغ ها، نتیجه تست همآگلوتیناسیون مثبت بود و تمامی سویه های ویروس قادر به آگلوتینه کردن گلبول های خون جوجه بودند.

مرحله RT

در بهینه سازی واکنش RT از دو آنزیم M-MULV و AMV استفاده گردید که محصولات هر دو واکنش مورد PCR قرار گرفته و در مرحله الکتروفورز در هر دو واکنش باند 900 bp مشاهده گردید. اگرچه باند مشاهده شده در مورد واکنش انجام شده با آنزیم AMV قابل رؤیت بود با این وجود در مورد آنزیم M-MULV باندها واضح تر و مناسب تر تشخیص داده شد، لذا از این آنزیم جهت تهیه cDNA استفاده گردید. هم چنین جهت انجام RT و تولید cDNA از RNA ویروس از پرایمر راندوم هگزامر استفاده گردید. در واکنش RT تعیین دمای اتصال مناسب برای پرایمر غیراختصاصی از حرارت 25 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه و 42 درجه سانتی گراد

به مدت 60 دقیقه استفاده شد و مشخص گردید که دمای اتصال پرایمر در مرحله RT، برای پرایمر غیراختصاصی 25 درجه سانتی گراد مناسب می باشد.

RT-PCR

پس از انجام RT-PCR و مشاهده نمونه های مورد بررسی بر روی ژل آگاروز، مشخص شد که هر شش نمونه مورد بررسی دارای باند 935bp بر روی ژل می باشند.

هضم با آنزیم محدود کننده PstI

پس از بررسی های بیوانفورماتیکی بر روی توالی های گزارش شده، فرآیند هضم آنزیمی توسط آنزیم PstI انجام گرفت و کلیه نمونه ها پس از هضم آنزیمی دو باند 720bp و 180 bp را نمایان ساختند. بنا بر این با توجه به توالی های DNA انتشار یافته و یافته های قبلی مشخص شد که نمونه های مورد بررسی دارای جایگاه یکسانی از نظر وجود آنزیم PstI بر روی قطعه 935bp ژن F می باشند.

مقایسه توالی سویه های مورد نظر

ژن امتزاجی (F) سویه های KND/20، KND/30، KND/35، KND/40 و KND/45 به کمک نرم افزار MEGA5 جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی مورد بررسی قرار گرفت. (تصویر شماره 1)

تصویر شماره 1. مقایسه توالی آمینو اسیدی بین سویه های مختلف NDV جدا شده از شیوع بیماری در ایران

بحث و نتیجه گیری

ویروس نیوکاسل در خانواده پارامیکسوویریده قرار دارد و پروتئین امتزاجی این ویروس عامل اصلی اتصال غشای ویروس و ورود ویروس به داخل سلول می باشد. نیوکاسل که یک عامل بیماری زای مسری در طیور بوده، زیان های اقتصادی فراوانی را در صنعت مرغ داری سبب می گردد. گفتنی است که این ویروس تحریک کننده سیستم ایمنی و فعالیت آنتی توموری را دارا می باشد، (۲۱،۲۳). برای مقایسه دقیق اطلاعات ژنتیکی و مشخص نمودن تفاوت های احتمالی، ترادف ژن های امتزاجی شش سویه ویروسی KN20/، KN30/، KN35/، KN40/ و KN45/ با استفاده از نرم افزار MEGA5 مورد آنالیز قرار گرفت. مقایسه ژن امتزاجی به طول 1655 نوکلئوتید نشان داد که در ناحیه جایگاه شکست ژن امتزاجی یعنی موقعیت نوکلئوتیدی 330 تا 347 بین شش سویه ویروسی مورد مطالعه هیچ گونه جهش نقطه ای وجود ندارد. این امر نشان دهنده اهمیت و میزان حفظ شدگی بالای ناحیه جایگاه شکست در بین سویه های مختلف مورد مطالعه می باشد. بررسی ها نشان می دهد که در طول توالی ژن امتزاجی، جهش های نقطه ای در برخی مناطق اتفاق افتاده است. در میان سویه های مورد نظر بیشترین میزان جهش در منطقه نوکلئوتیدی 820-890 به وقوع پیوسته است. از شش سویه ویروس نیوکاسل مورد مطالعه بیشترین فراوانی جهش مربوط به سویه KN30/ و کمترین فراوانی نیز مربوط به سویه MK13/75 می باشد. طی روند تکاملی جهش های نقطه ای که ممکن است در طول توالی ژن امتزاجی اتفاق افتد، می تواند منجر به جا به جایی آمینواسیدها از جمله در ناحیه شکست پروتئین امتزاجی و در نتیجه تبدیل یک ویروس با بیماری زایی کم به ویروس با شدت بیماری حاد گردد. به عبارت دیگر تغییر در موتیف آمینواسیدی جایگاه شکست پروتئین امتزاجی ممکن است در افزایش بیماری زایی

ویروس ها نقش داشته باشد، (۲۴،۲۵). توالی های نوکلئوتیدی حاوی ناحیه جایگاه شکست ژن امتزاجی شش سویه مورد بررسی برای پایگاه داده GeneBank ارسال و ثبت گردید. بر اساس مطالعات انجام شده، ویروس های بیماری نیوکاسل نوع ولوژنیک در جایگاه شکست پروتئین امتزاجی دارای توالی 113 R-Q-K/R-R116 در انتهای C پروتئین F2 و F (فنیل آلانین) در بنیان 117 انتهای N خود می باشند. در این مطالعه نیز سویه های مورد نظر همگی دارای موتیف آمینواسیدی سویه های حاد با ترادف R-RQ-R-R درحد فاصل آمینواسیدهای 112-116 و فنیل آلانین در موقعیت اسیدی 117 می باشند. وجود آمینواسیدهای جفت بازی در جایگاه شکست پروتئین امتزاجی از اختصاصات انواع NDV ولوژنیک بوده و امکان توزیع گسترده آن ها را فراهم ساخته است. (۲۲،۲۶،۲۷)

در بررسی آمینواسیدی جایگاه شکست پروتئین امتزاجی در بین سویه های مورد مطالعه هیچ گونه تغییر آمینواسیدی بین سویه ها مشاهده نگردید. در تمامی سویه های مورد نظر جایگاه آمینواسید گلوتامین (Q) و آرژنین (R) به ترتیب در موقعیت های 114 و 116 یکسان می باشند. مقایسه میان ویروس های مورد نظر تعدادی جابجایی آمینواسیدی بین ویروس ها مشاهده شده است که بیشترین اختلاف با KN30/ آمینواسید مربوط به ویروس نیوکاسل KN30/ جدا شده از استان کرمانشاه مشاهده گردید. براساس مطالعات این احتمال وجود دارد که مناطق یا توالی های دیگری هم در شکست پذیری F0 نقش داشته باشد. از آن جمله می توان به جا به جایی سرین موجود در موقعیت آمینواسیدی 486 به آرژنین، تبدیل گلوتامیک اسید موجود در موقعیت آمینواسیدی 430 یا آمینواسیدی 195 به گلايسين اشاره نمود ولی در واقع می توان گفت که نقش تغییرات آمینواسیدی در اطراف جایگاه شکست موثرتر می باشد.

References

1-Gravel KA, Morrison TG. Interacting domains of the hemagglutinin-neuramini-

dase and fusion proteins of newcastle disease virus. J Virol 2003;77:11040-9.

- 2-Yin H, Paterson RG, Wen X, Lamb RA, Jardetzky TS. Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus (hPIV3) fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:9288-93.
- 3-Ferrira L, Villar E, Munoz-Barroso I. Conformational changes of Newcastle disease virus envelope glycoproteins triggered by gangliosides. *Eur J Biochem* 2004; 271: 581-8.
- 4-Bogoyavlenskiy A, Berezin V, Prilipov A, Usachev E, Lyapina O, Korotetskiy I, et al. Newcastle disease outbreaks in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998, 2000, 2001, 2003, 2004, and 2005 were caused by viruses of the genotypes VIIb and VIId. *Virus Genes* 2009;39:94-101.
- 5-Waning DL, Russel CJ, Jardetzky TS, Lamb RA. Activation of a paramyxovirus fusion protein is modulated by inside-out signaling from the cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:9217-22.
6. Wang XJ, Bai YD, Zhang GZ, Zhao JX. Structure and Function Study of Paramyxovirus Fusion Protein Heptad Repeat Peptides. *Arch Biochem Biophys* 2005;436: 316-22.
- 7-Ludwig K, Bal JB, Herrmann A. 3d structure of the fusion primed sendai F- protein determined by electron cryomicroscopy. *EMBO J* 2003;22:3761-71.
- 8-Chen L, Gorman JJ, Mckimm BJ, Lawrence LJ. The struction of fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion. *Cell Press* 2001; 9:255-66.
- 9-Yu M, Wang E, Liu Y, Cao D. Six helix bundle assembly and characterization of heptad repeat regions from the F protein of Newcastle disease virus. *J Gen Virol* 2002; 83:623-9.
- 10-Seth S, Vincent A, Compans RW. Mutations in the cytoplasmic domain of a paramyxovirus fusion glycoprotein rescue syncytium formation and eliminate the HN protein requirement for membrane fusion. *J Virol* 2003;77:167-78.
11. Fuller CM, Collins MS, Easton AJ, Alexander DJ. Partial characterisation of five cloned viruses differing in pathogenicity, obtained from a single isolate of pigeon paramyxovirus type 1 (PPMV-1) following passage in fowls' eggs. *Arch Virol* 2007;152:1575-82.
- 12-Kattenbelt JA, Stevens MP, Selleck PW, Gould AR. Analysis of Newcastle disease virus quasispecies and factors affecting the emergence of virulent virus. *Arch Virol* 2010;155:1607-15.
- 13-Wang Y, Duan Z, Hu S, Kai Y, Wang X, Song Q, et al. Lack of detection of host associated differences in Newcastle disease viruses of genotype VIId isolated from chickens and geese. *Virol J* 2012;9:197-200.
- 14-Kianizadeh M, Aini I, Omar AR, Yusoff K, Sahrabadi M. Sequence and phylogenetic analysis of the fusion protein cleavage site of Newcastle disease virus field isolates from Iran. *J Virol* 2002;46:247-51.
- 15-Wan H, Wu Y, Lin X, Zhang R. Sequence analysis of the fusion protein genes of four Newcastle disease virus strains causing clinical disease in geese. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2002;42:208-13.
- 16-Messling VV, Cattaneo R. N-linked glycans with similar location in the fusion protein head modulate paramyxovirus fusion. *J Virol* 2003;77:10202-12.
- 17-Baron MD, Banyard AC, Parida S. Vaccin strain of rinderpest virus has attenuating mutations in most genes. *J Gen Virol* 2005; 86:1093-101.
18. Huang Z, Elankumaran S, Yunus AS. Recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious Bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *J Virol* 2004; 78:10054-63.
- 19-Huang Z, Panda A, Elankumaran S. Hemagglutinin-neuraminidase protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. *J Virol* 2004;78:4176-84.
- 20-Huang Z, Krishnamurthy S, Panda A, Samal SK. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *J Virol* 2003;77:8676-85.
- 21-Kovics S, Horvath J. Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol* 2000;16:1-15.
- 22-Romer- oberdorfer A, Werner O, Veits J, Mebatsion T, Mettenleiter TC. Contribution of the lentgh of the HN protein and the sequence of the F protein cleavage site to Newcastle disease virus pathogenecity. *J Gen Virol* 2003;84:3121-9.
- 23-Munir M, Linde AM, Zohari S, Stahl K, Baule C, Engstrom B, et al. Whole genome

sequencing and characterization of a virulent Newcastle disease virus isolated from an outbreak in Sweden. *Virus Genes* 2011; 43:261-71.

24-Merino R, Villegas H, Quintana JA, Calderon N. Characterization of Newcastle disease viruses isolated from chicken, gamefowl, pigeon and quail in Mexico. *Vet Res Commun* 2009;33:1023-30.

25-Shabbir M Z, Abbas M, Yaqub T, Mukhtar N, Subhani A, Habib H, et al. Genetic analysis of Newcastle disease virus from

Punjab, Pakistan. *Virus Genes* 2013;46: 309-15.

26-Solomon P, Bisschop S, Joannis TM, Shittu I, Meseko C, Sulaiman L, et al. Phylogenetic analysis of Newcastle disease viruses isolated from asymptomatic guinea fowls(*Numida meleagris*) and Muscovy ducks(*Cairina moscata*) in Nigeria. *Trop Anim Health Prod* 2012;45:53-7.

27-Dortmans J. CFM, Koch G, Rottier P, Peeters B. Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Vet Res* 2011; 42:122-8.



Identification of Newcastle Disease Virus F gene from Recent Outbreaks in Iran

Samadi T¹, Kiani zadeh M², Fathi Najafi M², Mousavi nasab S.D³, Hossein Nia Davatgar A. M⁴, Jafari M⁵, Ahmadi N.A^{6*}, Azizian R⁷

(Received: 15 Agu. 2012

Accepted: 17 Jan. 2013)

Abstract

Introduction: Newcastle disease is an extremely contagious disease that infects many species of birds. Newcastle Disease Virus (NDV) belongs to the paramyxoviridae family and genus Rubulavirus. The membrane of the virus particle contains HN and F glycoproteins. Cleavage of the F glycoprotein has a direct relation with the pathogenicity of the virus. The aim of this study was to determine the gene and protein sequences of F glycoprotein in virus strains isolated from recent outbreaks in Iran.

Materials & Methods: Six NDV Viruses were passaged and their RNA isolated. Using RT- PCR technique, cDNA preparation and amplification of the gene were done. Isolates were assessed by electrophoresis and observed with UV. The isolates were digested with restriction enzyme Pst I. Finally, in order to corroborate the ampl-

ified PCR product, DNA of isolates were purified, dried and sequenced.

Finding: In this study all of the NDV strains contained a 935 bp band that after digestion with Pst I, produce two bands 720 bp and 180 bp. Nucleotide analysis showed single base mutations but that was not significant amino acid sequence and analysis indicated no amino acid change in the cleavage site of F protein.

Discussion & Conclusions: Absence of point mutations in the cleavage site of F protein illustrated the importance of the maintained cleavage site of protein F among the strains studied.

Keywords: newcastle disease virus, F gene identification, mutation, Iran

1. Applied Research Center for Public Health and Sustainable Development, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran

2. Razi Serum and Vaccine Research Institute, Mashhad, Iran

3. Department of Virology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran

4. Department of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

5. North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnourd, Iran

6. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

7. Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

*(corresponding author)