

ایجاد پلاک توسط سویه V₄ ویروس عامل بیماری نیوکاسل بر روی کشت سلولی و بررسی مولکولی با روش واکنش زنجیره پلیمرز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)

ساناز سبحانی^۱، محمدجواد مهربانپور^{۲*}

چکیده

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

در این تحقیق، ابتدا سلول‌های Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) بصورت تک لایه و بطور استاندارد کشت داده شد. رقت‌های مختلف ویروس به سلول‌های تک لایه MDCK همراه با تریپسین، آگار و سولفات منیزیم اضافه شد. ویروس توانست بر روی سلول‌های فوق تکثیر و ایجاد اثر سایتوپاتیک (CPE) و پلاک نماید. در رقت ۱۰^{-۶} تعداد ۶ پلاک که از لحاظ شکل و اندازه تفاوت داشتند برداشته شدند و جهت تکثیر به تخم مرغ جنین دار ۹-۱۱ روزه تلقیح گردید. بعد از ۴۸ ساعت مایع آنتیوتیک هر تخم مرغ حاوی پلاک برداشت و نسبت به جداسازی RNA هر پلاک اقدام گردید. منطقه شکست (Cleavage site) پروتئین ادغامی (Fusion) با تست RT-PCR انجام شد و محصول PCR خالص‌سازی و سکانس گردید. سکانس نوکلئوتیدها و آمینواسیدها برای هر پلاک با سوش‌های ثبت شده در بانک ژنی مقایسه شد. سکانس نوکلئوتیدهای تمامی پلاک‌های بدست آمده، ۹۷ تا ۹۹٪ همخوانی با ویروس V₄ در بانک ژنی را تایید نمود. هدف از این پژوهش ایجاد پلاک از سوش V₄ ویروس نیوکاسل بر روی سلول‌های MDCK جهت ایجاد پلاک‌های مجزا و در نهایت بررسی مولکولی پلاک‌های ایجاد شده می‌باشد.

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

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۱۰

مقدمه

یکی از راه‌هایی که جهت شناسایی کلون‌های ویروسی مورد استفاده قرار می‌گیرد کشت ویروس بر روی سلول‌های مختلف می‌باشد که امروزه بطور وسیع بکار برده می‌شود. در خصوص

ویروس نیوکاسل انواع مختلف سلول‌ها مخصوصاً با منشا طیور و رده سلولی پستانداران جهت کشت و تکثیر ویروس مورد بررسی قرار گرفته است. از آنجا که بعضی ویروس‌ها به علت دیر رشد بودن قادر نیستند به راحتی بر روی بسیاری از رده‌های سلولی اولیه یا ثانویه رشد و تکثیر نمایند، لذا لازم است این ویروس‌ها بر روی کشت‌های سلولی سازگار شده و آنزیم‌های لازم در اختیار ویروس قرار گیرد (۱، ۳ و ۶). در تحقیقات Madhan Mohan در سال ۲۰۰۵ ویروس‌های سویه وحشی بر روی سلول‌های فیروبلاست جنین جوجه کشت داده شد و تغییرات آنها در طی ۵۰ بار پاساژ مورد بررسی قرار گرفت (۱۵). از طرفی Barahona و Hanson گزارش کردند که جهت ایجاد پلاک توسط سویه‌های لنتوژنیک ویروس بیماری نیوکاسل بر روی سلول‌های فیروبلاست جنین جوجه (Chicken embryo fibroblast) و Vero نیاز به تریپسین و منیزیم می‌باشد (۸). توانایی ویروس بیماری نیوکاسل جهت ایجاد پلاک در کشت‌های سلولی بستگی به بیماری‌زایی این ویروس دارد (۷). تکثیر ویروس‌های بیماری‌زا (ولوژنیک) در کشت سلول، معمولاً با انهدام سلول‌ها همراه است. اگر چه سویه‌های غیر بیماری‌زای (لنتوژنیک) ویروس نیوکاسل در بسیاری از رده‌های سلولی یا کشت‌های اولیه سلولی قادر به تکثیر و ایجاد پلاک نیستند (۷ و ۱۰). سویه‌های ولوژنیک و مزوژنیک ویروس عامل بیماری نیوکاسل می‌توانند بدون تریپسین در کشت سلولی رشد کرده و پلاک ایجاد نمایند. در

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

۲- موسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی، بخش ویروس‌شناسی، شیراز، ایران.

(mehrabanpourj@yahoo.com)

تکثیر سوش موردنظر در تخم مرغ جنین دار ۹-۱۱ روزه گردید و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰ - درجه سانتیگراد نگهداری شد.

تعیین تیر عفونت زایی ویروس

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

سلول: سلول MDCK به صورت استاندارد در پلیت مخصوص کشت سلولی ۶ خانه تکثیر داده شدند و در گرمخانه با شرایط ۵٪ CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرارداد شد پس از اینکه سلول‌ها کاملا به صورت تک‌لایه در آمدند جهت تلقیح ویروس بکار گرفته شد (۸).

محیط کشت سلول: محیط اختصاصی DMEM شرکت سیگما (D5523) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده تهیه گردید و با سرم جنین گاو (Fetal calf serum) غیرفعال شده به میزان ۵٪ غنی شد، پنی سیلین (Sigma)G به میزان ۱۰۰ واحد، جنتامایسین (Gibco) به میزان ۲ میلی‌گرم در هر سی‌سی، بی‌کربنات سدیم به میزان ۲٪، تریپسین به میزان ۲/۵ میکروگرم در هر سی‌سی اضافه شد و pH نهایی برابر ۷/۴ تنظیم گردید.

محیط کشت سلولی همراه با آگار

محیط کشت اختصاصی DMEM (Sigma)، آگارز ۰/۰۷٪ (Gibco)، تریپسین ۲/۵ میکروگرم با ۵٪ هر سی‌سی، بی‌کربنات سدیم (Sigma) ۲/۰٪، جنتا مایسین ۲ میلی‌گرم در هر سی‌سی و سولفات منیزیم مخصوص کشت سلولی (Sigma) ۰/۰۳ مولار تهیه گردید. نوترال رد (Gibco) با غلظت ۱:۱۰۰۰۰ نیز تهیه گردید.

ایجاد پلاک

بعد از ۴۸ ساعت که سلول‌های MDCK به صورت تک‌لایه در آمدند و در زیر میکروسکوپ معکوس کاملا از نظر تک لایه بودن مورد تأیید قرار گرفتند (نگاره ۱) رقت‌های مختلفی از ویروس (10^{-1} تا 10^{-10}) که قبلا تهیه شده بود به میزان ۲۰۰

صورتیکه سویه‌های لتوزن در محیط‌های کشت سول جهت انتشار و تکثیر و ایجاد پلاک نیاز به پروتئازهایی از جمله تریپسین و منیزیم دارند که در واقع این مسئله به ویژگی مولکولی و توالی اسید آمینه در منطقه شکستگی (cleavage site) پروتئین ادغامی (Fusion) ویروس مرتبط می‌شود (۹ و ۱۳). شکل و اندازه پلاک‌های ایجاد شده توسط سوش‌های متفاوت نیوکاسل نیز مستقیما با بیماری‌زایی آنها ارتباط دارد (۱۱ و ۱۶). سلول فیروبلاست جنین جوجه از جمله سلول‌هایی است که می‌تواند جهت سازگار کردن ویروس‌ها، تکثیر و انتشار ویروس عامل بیماری نیوکاسل مورد استفاده قرار گیرد اما از سلول‌های MDCK، جهت تکثیر ویروس نیز استفاده می‌گردد (۴ و ۲). در سال ۱۹۹۱ از RT-PCR جهت شناسایی ویروس نیوکاسل استفاده گردید پس از آن در سال‌های بعد استفاده از RT-PCR جهت تشخیص نیوکاسل توسط محققین صورت گرفت و از پرایمرهایی با اندازه‌های مختلف استفاده گردید بیشتر محققین ژن F را که منطقه شکست را در بر می‌گیرد مورد بررسی قرار دادند (۱۲) و از پرایمری که تقریبا ۹۰٪ طول ژن F را در بر می‌گرفت استفاده نمودند.

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

مواد و روش کار

ویروس: سوش اولیه ویروس به صورت لیوفیلیزه از بخش تولید واکسن‌های طیور موسسه رازی شیراز تهیه گردید سپس با ۲ سی‌سی PBS استریل مخلوط گردید پس از آن اقدام به

برداشت پلاک‌ها از چاهک‌ها

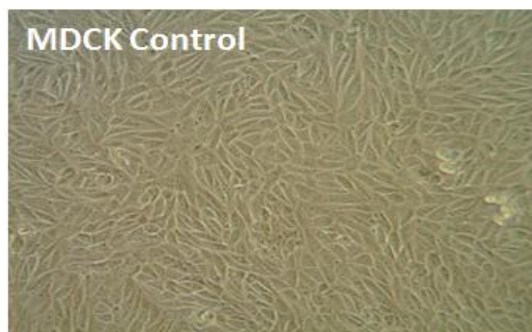
پس از مشاهده پلاک‌ها در زیر میکروسکوپ اقدام به برداشت پلاک از چاهکی که واضح‌ترین پلاک‌ها در آن وجود داشت گردید. پلاک‌های برداشت شده بطور مجزا هر کدام در ۱۰۰ میکرولیتر PBS/BSA استریل حل شدند و هر پلاک جداگانه به تخم‌مرغ‌های ۹ روزه تلقیح و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در انکوباتور، اقدام به برداشت مایع آلتوتوئیک گردید سپس به منظور حصول از تکثیر ویروس و وجود پلاک‌ها اقدام به انجام تست هم‌آگلوتیناسیون (Hemagglutination test) گردید، پس از آن تمام مراحل ایجاد پلاک بر روی سلول‌های MDCK مجدداً برای هر پلاک تا ۳ بار انجام گرفت.

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

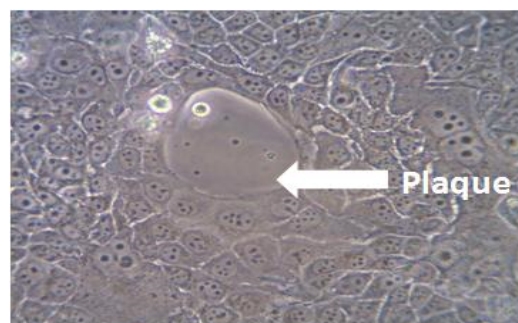
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر روی نمونه‌ها انجام گرفت. در استفاده از یک جفت پرایمر بر روی نمونه‌ها انجام گرفت. در این بررسی از کیت RT-PCR و آنزیم‌های مربوط به همان شرکت استفاده گردید. از یک جفت پرایمر با مشخصات ذیل که محصول آن ۱۳۴۹ bp می‌باشد استفاده گردید. (جدول ۱)

لاندرا بر روی هر حفره حاوی سلول‌های تک لایه تلقیح و به مدت نیم ساعت در انکوباتور با شرایط ۵٪ CO₂، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و رطوبت ۸۵٪ قرار داده شد و هر ده دقیقه شیک گردید. سپس محیط کشت سلول تهیه شده همراه با آگاراضافه گردید و در انکوباتور CO₂ دار با رطوبت ۸۵٪ نگهداری شد (۸ و ۵). بطور مرتب (هر ۱۲ ساعت) پلیت‌ها در زیر میکروسکوپ از لحاظ وجود تغییرات سلولی، ایجاد پلاک، اندازه پلاک و شکل پلاک مورد بررسی قرار گرفتند. در سلول‌های MDCK، ۴۸ ساعت بعد از تلقیح ویروس تغییرات سلولی مشاهده گردید و ۵۰ تا ۶۰ ساعت بعد از تلقیح ویروس، سلول‌ها مجدداً از نظر ایجاد پلاک مورد بررسی قرار گرفتند. بهترین پلاک بدست آمده در رقت ۱۰^{-۶} بود که تعداد ۶ پلاک مجزا که از لحاظ شکل و اندازه بایکدیگر تفاوت داشتند توسط سرنگ انسولین به روش استریل و در زیر هود آزمایشگاه بر داشت گردید. (نگاره ۲)



نگاره ۱- سلول‌های طبیعی از MDCK



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

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

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

قطعه

۱۳۴۹bp دربرگیرنده نوکلئوتیدهای ناحیه شکست پروتئین F میباشند. نمونه‌ها با توجه به برنامه دمایی مورد استفاده جهت انجام RT_PCR تنظیم و در دستگاه PCR قرار داده شدند. برنامه دمایی مورد استفاده جهت انجام RT-PCR شامل ۵۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، ۹۴، ۵۵ و ۶۸ درجه سانتیگراد هر یک به مدت یک دقیقه با ۴۰ بار تکرار و سپس ۶۸ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

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

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

خالص سازی محصول RT-PCR

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

تعیین توالی

نمونه‌های خشک شده همراه با پرایمرهای مربوط به شرکت MWG-Biotech آلمان (توسط شرکت فرایند دانش) ارسال

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

نتایج

نتایج بدست آمده از مشاهده روزانه پلئیت‌های کشت سلولی حاوی سلول‌های MDCK تلقیح شده با سوش V₄ ویروس عامل بیماری نیوکاسل نشان داد که در ۷۲ ساعت اول بعد از تلقیح هیچگونه تغییری در سلول‌های MDCK مشاهده نگردیده و در مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی که ویروسی به آنها تلقیح نشده بود از نظر ظاهری در زیر میکروسکوپ تفاوتی مشاهده نگردید و کلیه گروها به صورت سلول تک لایه مشاهده گردیدند، اما بعد از ۷۲ ساعت سلول‌ها شروع به تغییر کردند و کم کم حالت گرد شدن در آنها پدیدار گردید در حالی که ۸۰ ساعت بعد از تلقیح سلول‌های آلوده شده با ویروس حالت گرانوله شدن در سیتوپلاسم آنها مشاهده گردید و حالت گرد شدن در سلول‌ها به چشم می خورد و میکروپلاک‌ها در آنها مشاهده گردید در حالی که در

گردید که این ویروس جز ویروس‌های لتوژن بوده و کلیه پلاک‌های بدست آمده با ویروس‌های نیوکاسل نقاط مختلف جهان که در بانک ژنی ثبت شده شباهت داشتند. نتایج آنالیز سکانس اسید آمینه نشان داد که در منطقه شکستگی اسید آمینه ۱۱۱-۱۱۷ هیچگونه تغییری مشاهده نگردید و سکانس اسید آمینه تأیید کرد که تمامی پلاک‌ها متعلق به ویروس‌های لتوژنیک ویروس نیوکاسل بود و ردیف اسید آمینه بصورت $^{111} \text{G-G-R-G-G-R-L}^{117}$ بود.

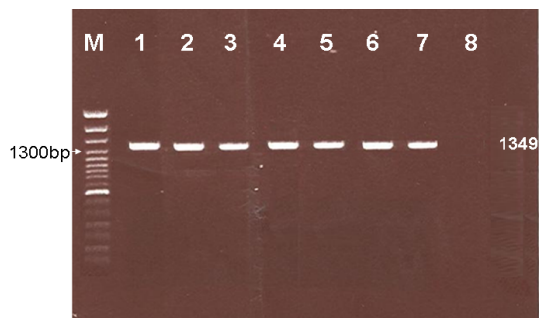
بحث

کشت سلولی یکی از بهترین روشها جهت سازگار کردن، تکثیر و انتشار ویروس‌هاست. ایجاد پلاک توسط سویه‌های مختلف ویروس نیوکاسل ارتباط مستقیم با بیماریزایی ویروس دارد (۷ و ۱۱). اگر چه سویه‌های غیربیماریزا (لتوژنیک) براحتی ایجاد پلاک نمی‌کنند و جهت ایجاد پلاک احتیاج به شرایط خاصی از جمله حضور تریپسین دارند ولی سویه‌های بیماریزای ولوژنیک براحتی ایجاد پلاک می‌کنند (۳). در تحقیقات Madhan Mohan در سال ۲۰۰۵ ویروس‌های سویه وحشی بر روی سلول‌های فیروبلاست جنین جوجه کشت داده شد و تغییرات آنها در طی ۵۰ بار پاساژ مورد بررسی قرار گرفت، قطر پلاک‌ها بر روی سلول‌های فیروبلاست جنین جوجه ۲-۴ میلی‌متر گزارش گردید (۱۵). kant در سال ۱۹۹۷ سویه‌های بیماریزا و غیر بیماریزا را بوسیله روش مولکولی RT-PCR مورد بررسی قرار داد و توانست با این روش این سویه‌ها را از یکدیگر تفکیک نماید (۱۲). براساس گزارش Kournikakis سلول‌های MDBK به علت اینکه به تریپسین حساس هستند جهت کشت سلولی ویروس‌های نیوکاسل با تریپسین مناسب نیستند لیکن توانستند با سلول‌هایی که از حساسیت کمتری به تریپسین برخوردارند پلاک ایجاد نمایند (۱۴). محققین بسیاری اندازه پلاک تشکیل شده توسط سوش‌های مختلف

سلول‌های گروه کنترل تغییری مشاهده نگردید (نگاره ۲). در تلقیح رفتهای مختلف (10^{-1} تا 10^{-10}) از ویروس سوش V4 به سلول‌های MDCK تنها در رقت 10^{-6} تعداد ۶ پلاک واضح و مجزا بدست آمد. در رقت‌های 10^{-3} تا 10^{-5} ۱۰ پلاک‌های واضح و قابل شمارشی مشاهده نگردید. پلاک‌های بدست آمده در رقت 10^{-6} از نظر شکل و اندازه با یکدیگر متفاوت بودند.

نتایج انجام PCR

نتایج PCR حاصل از تمام ۶ پلاک جدا شده از کشت سلولی بر روی سلول‌های MDCK نشان دهنده باند ۱۳۴۹bp بود که در کنار نمونه مثبت (سوش واکسن غیر فعال نیوکاسل رازی) مورد تأیید قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمامی نمونه‌ها همچنین کنترل مثبت باند واضح و مشخصی ایجاد نمودند که با توجه به مارکر بین باند ۱۳۰۰bp و ۱۴۰۰bp مارکر می‌باشد و در نتیجه باند ۱۳۴۹bp جهت نمونه‌ها و کنترل مثبت تأیید گردید (نگاره ۳).



نگاره ۳- الکتروفورز ژل آگاروز محصول RT-PCR ویروس‌های مورد مطالعه با اندازه ۱۳۴۹bp همراه با مارکر ۱۰۰bp. ستون ۱ تا ۶ نمونه‌های ویروس، ستون ۷ کنترل مثبت (سوش واکسن غیر فعال نیوکاسل رازی) و ستون ۸ کنترل منفی.

با استفاده از برنامه BLAST سکانس نوکلئوتیدهای تمامی ۶ پلاک بدست آمده مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و ۹۷ تا ۹۹٪ شباهت با سوش V4 موجود در بانک ژنی به شماره EF464163.1 مورد تأیید قرار گرفت و بدین ترتیب مشخص

ویروس بیماری نیوکاسل را مرتبط با بیماری‌زایی آنها می‌دانند و گفته اند که سوش‌های بیماریزا پلاک‌های بزرگتری نسبت به سوش‌های غیر بیماری‌زا ایجاد می‌کنند بطوریکه سوش‌های غیر بیماری‌زا ویروس نیوکاسل خیلی کم یا اصلاً "پلاک تولید نمیکنند مگر آنکه شرایط خاصی مهیا گردد که بطور مشخص اضافه کردن تریپسین در محیط کشت است(۱). در این تحقیق پلاک‌های ایجاد شده توسط ویروس در ۸۰ ساعت پس از تلقیح ویروس سازگار شده به سلول‌های فیبروبلاست جنین جوجه به‌وضوح مشاهده گردیدند، این در حالی است که Kournikakis و همکاران اعلام کردند که ۴۸ ساعت پس از تلقیح ویروس‌های کم بیماریزا به سلول‌های LLC-MK2 پلاک‌ها بطور مشخص مشاهده شدند(۱۴). در عین حال ماکزیمم عیار ویروس را ۳ روز پس از تلقیح گزارش کردند(۱۴). در واقع تفاوت در شکل و اندازه پلاک‌های ایجاد شده در نتیجه حضور ویروس را می‌توان به نوع سلول مورد استفاده در کشت سلولی و همچنین نوع سویه ویروس مورد استفاده مرتبط دانست که اینها در زمان ایجاد پلاک نیز نقش دارند. براساس مطالعات بارهونا مدت زمان نگهداری سلول‌های کشت سلولی هم می‌تواند در اندازه پلاک‌ها تأثیر داشته باشد، میزان تریپسین و مدت زمان حضور ویروس بر روی سلول‌های کشت سلولی هم در این خصوص بی تأثیر نخواهد بود (۸). در مطالعات Kournikakis مشخص گردید که میزان تریپسین جهت ایجاد پلاک ضروری است، بطوریکه میزان ۵ میکروگرم بر میلی لیتر تریپسین در محیط کشت باعث از هم پاشیدگی سلول‌ها میگردد و میزان ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر تریپسین بر اساس مطالعات محققان جهت ایجاد پلاک توسط ویروس‌های نیوکاسل مناسب میباشد (۱۴). ویروس‌های ولوژن در محل شکستگی پروتئین F در موقعیت ۱۱۲ به ۱۱۳ و ۱۱۵ به ۱۱۶ دو زوج اسید آمینه بازی لیزین و یا آرژنین و اسید آمینه فنیل آلانین در موقعیت ۱۱۷

قرار دارد(۶). وجود این اسید آمینه بازی در ویروس‌های ولوژنیک باعث میشود پروتئازهای میزبان که در بسیاری از بافتهای بدن یافت میشوند F0 تبدیل به دو زیر واحد گردد. بنابر این در کشتهای سلولی جهت تکثیر و رشد به آنزیمهای شبه تریپسین نیاز ندارند (۵). نتایج بررسی مولکولی بدست آمده در این مطالعه از هر کلون، بطور مجزا نشان داد که تفاوتی در سکانس ژنی و ردیف نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه، وجود دارد اما با وجود تفاوتی مشاهده شده در ردیف اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدی، مشاهده گردید که ردیف اسیدهای آمینه و نوکلئوتیدی تمامی کلون‌ها در منطقه پروتئین F با ویروس ۴۶۴۱۶۳.۱ EF شباهت دارند و این نشان دهنده این است که ویروس واکسن یقیناً جزء لنتوژن‌ها بوده و در نتیجه استفاده متمادی از سوش اولیه جهشی که منجر به تغییر در منطقه شکستگی پروتئین F گردد بوجود نیامده است. در تمامی ۶ کلون مورد بررسی اسیدهای آمینه در منطقه شکننده پروتئین F بصورت G-G-R-G-G-R-۱۱۷ بدست آمد.

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

فهرست منابع

- 1- Alexander, K., Pinhans, F. (1969): Cell fusion various strains of Newcastle disease virus and their virulence. *J. Virol.* 3(5): 539-540
- 2- Alexander, D.J., Wilson, G.W., Russell, P.H., Lister, S.A., Parsons, G. (1985): Newcastle disease outbreaks fowl in Great Britain during (1984). *Vet. Rec.* 117(17):429-434.
- 3- Alexander, D. J. (1989): Newcastle disease, In: *A Laboratory Manual for Isolation and Identification of Avian Pathogens*. 3rd edition (ed. Swayne DE). International Book Distribution Co. USA; 114-120.
- 4- Alexander, D.J. (1995): The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *J. Comp. Pathol.* 112(2):105-126.
- 5- Ahmed, T., Hossain, K.H., Billah, M.M., Islam, M.E. (2004): Adaptation Newcastle disease virus (NDV) on Vero cell line. *Int. J. Poult. Sci.* 3(2):153-156.
- 6- Ansanth, R., Kirubaharan, J. John., Priyadarhini, M.L.M., Albert, A. (2008): Isolation of Newcastle disease viruses of high virulence in unvaccinated healthy village chickens in south India. *Int. J. Poult. Sci.* 7(4):368-373
- 7- Balkovetz, D.F. (1998): Hepatocyte growth factor and Madian-Darby canine kidney cells: in vitro models of epithelial cell movement and morphogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 43(5):456-630.
- 8- Barhona, H.H., Hanson, R.P. (1986): Plaque enhancement of Newcastle disease virus (lentogenic strain) by magnesium and diethylaminoethyl dextran. *Avian. Dis.* 12(1): 151-158.
- 9- Cross, G.M. (1988): Newcastle disease vaccine production. In: *Newcastle Disease*, (ed. Alexander DJ). Kluwer Academic Publishers, Massachusetts; 333-346
- 10- Hemmatzadeh, F., Nayeri, B., Tofighi, E.R. (2006): Antigenic difference in Newcastle viruses isolated in Iran. *Int. J. Pout. Sci.* 5(5):408-410.
- 11- Jayawardana, G.W., De Alwis, M.C., Bandara, D. (1990): Oral vaccination of chickens against Newcastle disease with V4 vaccine delivered on processed rice grains. *Aust. Vet. J.* 67: 364-366.
- 12- Kant, A., Koch, G., Roozelaar, D.J., Balk, F. (1997): Differentiation of virulent and non-virulent strain of Newcastle disease virus within 24 hours polymerase chain reaction. *Avian. pathol.* 26(4): 837-849.
- 13- Knipe, D.M., Howley, P.M. (2001): *Fields Virology* 4th edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA, P: 1305-1309.
- 14- Kournikakis, B., Fildes, J. (1988): Titration of avirulent Newcastle disease virus by the plaque assay method. *J. Virol. Method.* 20(4):285-293.
- 15- Mohan, M., Sohini, D., Kumanan, K. (2005): Molecular changes of the fusion protein gene of chicken embryo fibroblast-Adapted velogenic Newcastle disease virus: effect on its pathogenicity. *Avian Dis.* 49(1): 56-62.

