تعیین ردیف نوکلئوتیدي و قرابت فیلوژنتیکي ژن *Tax* ویروس لوسمي گاو در ایران

حسن ممتاز[1*]، پوریا امیني[2]، بهنام عباسیان[2]

۱. گروه میکروبیولوژي، دانشکده دامپزشکي، دانشگاه آزاد اسلامي واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. دانش‌آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکي، دانشگاه آزاد اسلامي واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: hamomtaz@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۸۷/۱۱/۲۴، پذیرش نهایي: ۸۸/۷/۶)

چکیده
ویروس لوسمي گاو (BLV) از خانواده رتروویریده، دون خانواده ارتورتروویرینه و جنس دلتارتروویروس واجد ۳ ژن ساختماني اصلي env، pol، gag و تعدادي ژن تنظیم‌کننده همانند-سازي از جمله Tax، Rex، R III و C IV مي‌باشد. به منظور تعیین قرابت فیلوژني ژن Tax ویروس BLV در نمونه‌هاي آلوده به این ویروس در ایران در ابتدا قطعه ۹۲۷ جفت بازي ژن Tax از چهار نمونه آلوده در سیستم PCR تکثیر و جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدي سکانس گردید. نتایج حاصل از مقایسه ردیف نوکلئوتیدي تعیین شده در این مطالعه با سکانس شناخته شده ژن Tax ویروس BLV در سایر کشورها نشانگر وجود ۳/۴ تا ۷/۷ درصد تنوع ژنتیکي در این ژن بود که در این میان بیشترین قرابت با ردیف نوکلئوتیدي ژن Tax در آمریکا (سکانس AY۷۰۰۳۷۸,۱) با ۹۶/۶ درصد تشابه و بیشترین تفاوت مربوط به جدایه این ویروس در استرالیا (سکانس AY۷۰۰۳۷۹,۱) و ژاپن (سکانس AY۷۰۰۳۸۱,۱) با ۹۲/۳ درصد قرابت مشاهده شد.
مجله دامپزشکي دانشگاه آزاد اسلامي واحد تبریز، ۱۳۸۸، دوره ۳، شماره ۲، ۴۸۳-۴۷۷.
کلمات کلیدی: ویروس لوسمي گاو، ژن *Tax*، قرابت فیلوژنتیکي، ایران

مقدمه
بیماری لوکوز انزئوتیک گاو در اثر ویروس لوسمی گاو (Bovine Leukemia Virus) از جنس دلتارتروویروس (Deltaretrovirus)، دون خانواده ارتورتروویرینه (Orthoretrovirinae) و خانواده رتروویریده (Retroviridae) ایجاد و به صورت رشد نئوپلاستیک لنفوسیت-ها که اغلب اعضای بدن را درگیر می‌کند، اتفاق می‌افتد (۱، ۵ و ۱۶).
ژنوم رتروویروس‌ها دیپلوئید و هر قطعه هاپلوئیدی آن یک مولکول RNA تک رشته‌ای مثبت با اندازه ۷ تا ۱۱ کیلو باز می‌باشد. رتروویروس-های کامل واجد سه ۳ ژن اصلی *gag* که اختصاصی گروه بوده و باعث کد-شدن پروتئین‌های هسته مرکزی ویروس می‌شود، *pol* (پلی مراز) که آنزیم-های دخیل در تکثیر ویروس یعنی آنزیم رونوشت‌برداری معکوس را کد می‌کند و *env* (envelope) که باعث کدکردن گلیکوپروتئین‌های غشاء ویروس می-شود و تعدادي ژن تنظیم‌کننده همانندسازي نظیر CVI، RIII، Rex و Tax هستند. این ویروس-ها قادر به ایجاد پرووویروس از جنس DNA در سلول‌های آلوده به خود می‌باشند (۲، ۳ و ۲۲). پروتئین Tax داراي چندین اپي‌توپ شناسایي براي

لنفوسیت‌هاي T سیتوتوکسیك است و مي‌تواند پاسخ این سلول‌ها را القا کند (۲۱). به واسطه اهمیت این ژن در رتروویروس‌ها، امروزه استفاده از ژن Tax در طراحي واکسن‌هاي DNA به‌ویژه در عفونت‌هاي انساني نظیر بیماري ناشي از HTLV-۱ مورد توجه قرار گرفته است و مشخص شده که واکسیناسیون علیه عفونت ناشي از HTLV-۱ با استفاده از پروتئین نوترکیب Tax مي‌تواند پاسخ قوي از لنفوسیت‌هاي T سیتوتوکسیك را تحریك کند (۸ و ۲۳). لوکوز گاوي امروزه به عنوان معضل سیستم گاوداري‌هاي صنعتي در جهان مورد توجه بوده و هر کجاي دنیا که سیستم‌هاي گاوداري مدرن در پرورش گاوهاي شیري وجود دارد، لوکوز گاوي به عنوان یك معضل اساسي مدنظر قرار گرفته است و امروزه تلاش‌هاي فراواني جهت دست‌یابي به یك روش پیشگیري مناسب انجام شده یا در حال انجام است (۱۶). در ایران تاکنون اقدامي در جهت پیشگیري از بیماري به روش واکسیناسیون و یا ساخت واکسن و طراحي روش‌هاي تشخیص بیماري صورت نگرفته است. همت زاده و ممتاز در سال‌هاي اخیر اقدام به شناسایي پروتئین‌هاي ویروس BLV در بافت‌هاي تومورى شده توسط ویروس کرده و تنوع پروتئیني ویروس را مشخص نموده‌اند. در ادامه پادگن‌هاي دخیل در تحریك پاسخ ایمني هومورال به روش وسترن بلات مشخص و پادگن‌هاي p۲٤ و gp٥۱ در بافت‌هاي مبتلا به لنفوسارکوم شناسایي و ژن‌هاي gag و Tax ویروس در سلول *E.coli* کلون‌سازي و بیان شده است (٦، ۷، ۱۲ و ۱٤). از آنجایي که تنوع ژنتیکي ژن Tax ویروس لوکوز گاوي در سویه‌هاي ایران شناسایي نشده است، لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین ردیف نوکلئوتیدي ژن Tax در نمونه‌هاي ایران و مقایسه ردیف نوکلئوتیدي این ژن با سایر کشورها طرح‌ریزي شده است.

مواد و روش‌کار

۱-نمونه‌ها: DNA تخلیص شده از بافي‌کوت و عقده لنفاوي تعدادي از گاوهاي آلوده به لوکوز گاوي که در مطالعات قبلي از نظر سرمي و مولکولي پاسخ مثبت نشان داده بودند (٤ و ۱۲) به همراه نمونه ویروس BLV رشد کرده در کشت سلولي FLK (Fetal Lamb Kidney) (Svanova Biotech, Uppsala, Sweden) به عنوان نمونه کنترل مثبت.

۲-آزمایش PCR: جهت تکثیر ژن Tax ویروس BLV در DNA تخلیص‌شده از نمونه‌هاي مورد مطالعه از زوج پرایمرهاي نشان داده شده در جدول ۱ که بر اساس سکانس ژن Tax ویروس ثبت شده در بانك ژني طراحي شد استفاده گردید:

جدول ۱- پرایمرهاي مورد استفاده جهت آنالیز ژن Tax ویروس BLV

Primer name	Primer sequence	Size of Product (bp)	Accession number
BLV-Tax-F	٥`-GCAAGTGTTGTTGGTTGGGG-۳`	۹۲۷	AY۷۰۰۳۷۸,۱
BLV-Tax-R	٥`- TCAAAAAAGGCGGGAGAGCC-۳`		

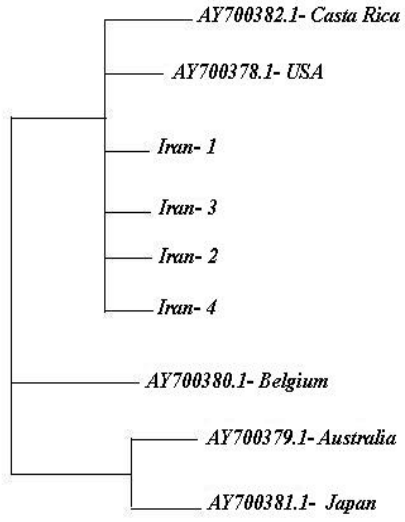
جهت انجام آزمایش PCR و تکثیر قطعه ژنی Tax از دستگاه Master cycler gradient (Eppendorf Germany Co.) با حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر PCR buffer ۱۰x، ۲ میلی‌مول Mgcl۲، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۲ میکرومول از زوج پرایمرهایBLV-Tax-F و BLV-Tax-R، ۱ واحد آنزیم ۱ واحدی Tag DNA Polymerase (Roche applied science) و ۱ میکروگرم از DNA هر نمونه استفاده شد. برنامه حرارتی مورد استفاده عبارت بود از:
یک سیکل ۹۴ درجه ٤ دقیقه، ۳۳ سیکل تکراری ۹٤ درجه ۱ دقیقه، ۵۸ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۵۰ ثانیه و سیکل انتهایی ۷۲ درجه ٦ دقیقه (۱۷).

۳-تعیین ردیف نوکلئوتیدی: محصول PCR مربوط به ٤ نمونه از نمونه‌های مثبت شده در آزمایش PCR جهت تعیین ردیف نوکلئوتیدی قطعة تکثیریافته در PCR به شرکت Macrogen کره ارسال گردید.

٤-تعیین قرابت نوکلئوتیدی: نمونه‌های سکانس شده در این مطالعه با سکانس ژن Tax ویروس BLV در سایر کشورها (ثبت شده در بانک ژنی NCBI) با استفاده از نرم افزار ClustalX و Njplot مقایسه و ضمن تعیین Sequence identity matrix، درخت فیلوژنی مربوطه رسم شد.

نتایج

ردیف نوکلئوتیدی ژن Tax ویروسBLV مربوط به ٤ نمونه از نمونه‌های مثبت شده در آزمایش PCR سکانس و با استفاده از نرم افزار ClustalX با ردیف نوکلئوتیدی این ژن ثبت شده در بانک ژنی (National NCBI Center for Biotechnology Information، 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 نگاره ۱ و میزان قرابت بین ژن Tax ویروسBLV در ایران با سایر کشورها در جدول ۲ نشان داده شده است



نگاره۱- درخت فیلوژنتیکی مربوط به ردیف نوکلئوتیدی ژن Tax ویروسBLV در ایران با تعدادی از سکانس‌های ثبت شده این ژن در بانک ژنی

جدول۲- نتایج حاصل از مقایسه ردیف نوکلئوتیدی ژن Tax ویروسBLV در ایران با تعدادی از سکانس‌های ثبت شده این ژن در سایر کشورها
(Identity Matrix Sequence)

Seq	AY۷۰۰۳۷۸,۱ USA	AY۷۰۰۳۸۱,۱ Japan	AY۷۰۰۳۸۰, Belgium	AY۷۰۰۳۵۲۰ Costa Rica	AY۷۰۰۳۷۹۰ Australia	Iran ۱	Iran ۲	Iran ۳	Iran ٤
AY۷۰۰۳۷۸,۱ USA	ID	۰/۹٦۷	۰/۹٦٦	۰/۹٤۹	۰/۹٤۹	۰/۹٦٦	۰/۹٦٤	۰/۹٦۳	۰/۹٦۲
AY۷۰۰۳۸۱,۱ Japan	۰/۹٦۷	ID	۰/۹۵۷	۰/۹٤۲	۰/۹٤۲	۰/۹۲٦	۰/۹۳	۰/۹۲۳	۰/۹۲۹
AY۷۰۰۳۸۰,۱ Belgium	۰/۹٦٦	۰/۹۵۷	ID	۰/۹۵٤	۰/۹۵	۰/۹۵۱	۰/۹۵	۰/۹٤۹	۰/۹۵۲
AY۷۰۰۳۸۲,۱ Costa Rica	۰/۹٤۹	۰/۹٤۲	۰/۹۵٤	ID	۰/۹۳۳	۰/۹٦۲	۰/۹٦۱	۰/۹۵۹	۰/۹٦۳
AY۷۰۰۳۷۹,۱ Australia	۰/۹٤۹	۰/۹٤۲	۰/۹۵	۰/۹۳۳	ID	۰/۹۲۵	۰/۹۲۹	۰/۹۲۳	۰/۹۲۸
Iran-۱	۰/۹٦٦	۰/۹۲٦	۰/۹۵۱	۰/۹٦۲	۰/۹۲۵	ID	۰/۹۸۱	۰/۹۷۹	۰/۹۸۲
Iran-۲	۰/۹٦٤	۰/۹۳	۰/۹۵	۰/۹٦۱	۰/۹۲۹	۰/۹۸۱	ID	۰/۹۸۱	۰/۹۸٦
Iran-۳	۰/۹٦۳	۰/۹۲۳	۰/۹٤۹	۰/۹۵۹	۰/۹۲۳	۰/۹۷۹	۰/۹۸٤	ID	۰/۹۸۵
Iran-٤	۰/۹٦۲	۰/۹۲۹	۰/۹۵۲	۰/۹٦۳	۰/۹۲۸	۰/۹۸۲	۰/۹۸٦	۰/۹۸۵	ID

بحث و نتیجه‌گیری

تشخیص و مطالعه عفونت‌های رتروویروسی از جهات مختلف می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. نتایج مطالعات زیادی که روی ویروس نقصان ایمنی انسان (HIV) انجام گرفته زمینه بسیار وسیعی را پیرامون مطالعه تنوع ژنتیکی، چگونگی تشخیص، مطالعات اپیدمیولوژیک و نهایتاً راهکارهای مناسب برای پیشگیری از عفونت‌های رتروویروسی فراهم آورده است. در بین عفونت‌های رتروویروسی دام‌ها، لوکوزانزئوتیک گاوها در صدر اهمیت قرار دارد و از همین رو است که تحقیقات بسیار گسترده‌ای در مورد روش‌های تشخیص، کنترل و پیشگیری از این بیماری با استفاده از روش‌های سرولوژیک و مولکولار بیولوژیک انجام گرفته و می‌گیرد.

به واسطه خصلت طبیعی رتروویروس‌ها که ناشی از رونوشت‌برداری معکوس از ژنوم آنهاست وقوع موتاسیون و در نتیجه تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی آنها از وفور بالایی برخوردار است و همین خصلت است که ارزش تشخیصی بسیاری از آزمون‌های آزمایشگاهی را زیر سوال می‌برد. مقالات زیادی را می‌توان یافت که به اعداد و ارقام خاصی تحت عنوان حساسیت و ویژگی در تست‌های تشخیصی اشاره نموده‌اند. تکرار همین آزمون توسط

محققین دیگر معمولاً با نتایج متفاوتی همراه بوده است که علت این مسئله را می‌توان در تنوع ژنتیکی این ویروس جستجو نمود.
در بین ژن‌های ساختمانی ویروس BLV ژن‌های gag ، pol و env ازجمله ژن-های نسبتاً حفاظت شده هستند که تنوع ژنی در بین آنها کمتر دیده شده و به واسطه همین خصلت طبیعی امروزه از روشهای تشخیص بیولوژی مولکولی بر پایه PCR، کلونینگ و... با استفاده از ردیابی پروویروس BLV و یا ژن‌های ساختمانی مذکور طراحی شده-اند. رتروویروس‌های پیچیده علاوه بر این ۳ ژن ساختمانی ژن‌های تنظیم‌کننده‌ای نظیر Tax وRex وRIII وCIV را نیز کد می‌کنند که در همانندسازی ویروس دخالت داشته و همین امر پایداری و قدرت بیماری-زایی آنها را افزایش می‌دهد (۹، ۲۱ و ۲۳).
ژن Tax پروتئینی را کد می‌کند که در همانندسازی ویروس ضروری بوده و باعث تورم غدد می‌شود. از طرفی این ژن باعث تحریک همانندسازی از چند ژن سلولی از جمله ژن مولد ۲-IL می‌شود (۱۱ و ۱۵). *Tax* به‌عنوان گیرنده برای آنزیم‌های آلفا و بتا پلی‌مراز عمل می‌کند (۱۰ و ۱۸) و مطالعات جدید نشان می‌دهد که در سرطان‌زایی رتروویروس‌ها خصوصاً سرطان سلول‌های خونی نقش دارد (۲۱). پروتئین Tax دارای چندین اپی‌توپ شناسایی برای لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک است و می‌تواند پاسخ این سلول‌ها را القاء کند. به واسطه اهمیت این ژن در رتروویروس‌ها امروزه استفاده از این ژن در طراحی واکسن‌های DNA به ویژه در عفونت-های انسانی نظیر بیماری ناشی از HTLV-۱ مورد توجه قرار گرفته است و مشخص شده که واکسیناسیون علیه عفونت ناشی از HTLV-۱ با استفاده از پروتئین نوترکیب Tax می‌تواند پاسخ قوی لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک را تحریک کند (۸، ۱۹، ۲۰ و ۲۳).
مطالعه حاضر با هدف ردیابی ژن *Tax* ویروس BLV، تعیین ردیف نوکلئوتیدی این ژن و بررسی تنوع ژنتیکی آن انجام گرفت و همان‌گونه که در قسمت نتایج ذکر شد یکی از اهداف اصلی این بررسی یعنی ردیابی ژن *Tax* در نمونه‌های آلوده به BLV برای اولین بار در ایران به تحقق پیوست و وجود ژن مذکور با توسل به روش تعیین ردیف نوکلئوتیدی (Sequencing) قطعه مربوطه مورد تأیید قرار گرفت. تعیین ردیف نوکلئوتیدی قطعه ۹۲۷ جفت بازی تکثیر یافته در PCR در تقریبا ۹۰۰ نوکلئوتید از چهار نمونه سکانس‌شده انجام گرفت. در قسمت دیگر این تحقیق به منظور تأیید ردیف نوکلئوتیدی ژن Tax 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 سکانس-های شناخته شده این ژن در بانک ژنی NCBI گردید. مقایسه ردیف‌های ژنی حاکی از وجود ۱/۵ تا ۲/۱ درصد تنوع در چهار نمونه سکانس-شده در ایران و ۳/٤ تا ۷/۷ درصد تنوع بین نمونه‌های ایران با سایر کشورها بود (جدول ۱) که در این میان بیشترین قرابت مربوط به سکانس شناخته شده این ژن در آمریکا (سکانس AY ۷۰۰۳۷۸,۱) با ۹٦/٦ درصد قرابت و بیشترین تفاوت مربوط به جدایه این ویروس در استرالیا (سکانس AY ۷۰۰۳۷۹,۱) و ژاپن (سکانس AY ۷۰۰۳۸۱,۱) با ۹۲/۳ درصد 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 نگاره (۱) مشاهده می-شود، سویه‌های ایران در شاخه سکانس آمریکا قرار دارد و تفاوت معنی‌داری را با سکانس شناخته شده ژن Tax در استرالیا و ژاپن نشان می‌دهد. در مطالعه انجام شده توسط ممتاز و همکاران که به منظور تعیین قرابت ژنتیکی ژن gag ویروس BLVدر ایران انجام گرفت نیز ۱ تا ۸/۷ درصد تنوع ژنتیکی در ژن gag ویروس مشاهده شد که در این میان بیشترین قرابت با سکانس‌های شناخته شده این ژن در آمریکا (سکانس‌های M ۱۰۹۸۷,۱ و NC ۰۰۱٤۱٤,۱) و بیشترین تفاوت مربوط به جدایه این ویروس در استرالیا (سکانس D ۰۰٦٤۷,۱) مشاهده شد (۱۳).

مشاهده تنوع نه‌چندان چشمگیر ردیف ژنتیکی ژن Tax ویروس BLV را می-توان بر اساس گسترش جغرافیایی ویروس توجیه نمود. با توجه به اینکه منشاء بسیاری 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 و استرالیا) با ایران سابقه تاریخی ندارد لذا استقرار سویه‌های ژاپنی و استرالیایی ویروس در شاخه دیگر درخت فیلوژنی نشانگر تفاوت بیشتر ردیف ژنی Tax این ویروس بین ایران با کشورهای مزبور می‌باشد.

فهرست منابع

۱. کارگرموخر، ر.، حسامي قاجار، م.، اهورايي، پ.، قابوسي، ب.، خدمتي، ك.، عزي، ع.، پورزاهدي، ر. و سرمست، ر. (۱۳۷۵): بررسي سرواپيدميولوژيك بيماري لوكوز انزئوتيك گاوان (EBL) در ايران. پژوهش و سازندگي، سال ۹، جلد ۱، صفحات: ۱٦۷-۱٦٤.

۲. كيوانفر، ه. و كريمي، ن. (۱۳۷٦): ويروس‌شناسي دامپزشكي (بخش بيماري‌ها). چاپ اول، مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، شماره ۲۳۵۷، صفحات: ۳۳۵-۳۲٤ و ۳٤٤.

۳. كيوانفر، ه.، همت‌زاده، ف. و محموديان، ع. (۱۳۸۰): ويروس‌شناسي دامپزشكي (بيولوژي ويروس‌ها). انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ٤۳، ۵۷، ٦۱، ٦۵ و ۸۲-۸۰.

٤. ممتاز، ح. و همت زاده، ف. (۱۳۸۲): بررسي سرولوژيك آلودگي با ويروس BLV در گاوداري‌هاي استان چهارمحال و بختياري. مجله تحقيقات دامپزشكي ايران، دانشگاه شيراز، دوره ٤، شماره ۱، صفحات: ٤٤-۳۷.

۵. نورمحمدزاده، ف. و برين، ع. (۱۳۷۰): جستجوي سرولوژيكي پادتن ضد لوكوز انزئوتيك گاوي (BLV) در گوسفند. مجله دانشكده دامپزشكي دانشگاه تهران، ٤٦دوره ٤٦، شماره ۱، صفحات:۸۰-٦۹.

٦. همت زاده، ف. و ممتاز، ح. (۱۳۸۳): مطالعه الگوي الكتروفورتيك پروتئيني عصاره عقده‌هاي لنفاوي گاوهاي لوكوزي و مقايسه آن با گاوهاي به ظاهر سالم. مجله دانشكده دامپزشكي دانشگاه تهران، دوره ۵۹، شماره ۲، صفحات: ٤۷-٤۳.

۷. همت زاده، ف. و ممتاز، ح. (۱۳۸٦): رديابي پادگن‌هاي دخيل در پاسخ ايمني هموارل در عقده‌هاي لنفاوي گاوهاي مبتلا به لوكوز گاوي. مجله تحقيقات دامپزشكي، دانشگاه تهران، دوره ٦۲، شماره ۵، ۲۸٤-۲۸۱.

۸. Boris-Lawrie, K., Altanerova, V., Altaner, C., Kucerova, L. and Temin, H.M. (۱۹۹۷): In vivo study of genetically simplified bovine leukemia virus derivatives that lack tax and rex. Journal of Virology., ۷۱(۲): ۱۵۱٤-۱۵۲۰.

۹. Corcelette, S., Massé, T. and Madjar, J.J. (۲۰۰۰): Initiation of translation by non-AUG codons in human T-cell lymphotropic virus type I mRNA encoding both Rex and Tax regulatory proteins. Nucleic Acids Research, ۲۸(۷): ۱۶۲۵-۱۶۳٤.

۱۰. Debacq, C., Asquith, B., Kerkhofs, P., Portetelle, D., Burny, A., Kettmann, R. and Willems, L. (۲۰۰۲): Increased cell proliferation, but not reduced cell death, induces lymphocytosis in bovine leukemia virus-infected sheep. Proceding National Academic Science USA, ۹۹(۱۵): ۱۰۰٤۸-۱۰۰۵۳.

۱۱. McGirr, K.M. and Buehring, G.C. (۲۰۰٦): Tax & rex: overlapping genes of the deltaretrovirus group. Virus Genes., ۳۲(۳): ۲۲۹-۲۳۹.

۱۲. Momtaz, H. (۲۰۰۹): Expression of bovine leukemia virus Tax protein in bacterial cell. Research Journal of Biological Science, ٤(۵): ۵٤۲-۵٤٦.

۱۳. Momtaz, H., Hemmatzadeh, H. and Amiri, E. (۲۰۰۹): Cloning and phylogenetic analysis of Bovine Leukemia Virus p۲٤ gene of Iranian isolate. Research Veterinary Science. In Press.

۱٤. Momtaz, H., Hemmatzadeh, H. and Keyvanfar, H. (۲۰۰۸): Expression of bovine leukemia virus p۲٤ protein in bacterial cell. Pakistan Journal of Biological Science, ۱۱(۲۰): ۲٤۳۳-۲٤۳۷.

۱۵. Pyeon, D. and Splitter, G.A. (۱۹۹۹): Regulation of Bovine Leukemia Virus tax and pol mRNA levels by interleukin-۲ and -۱۰. Journal of Virology, ۷۳(۱۰): ۸٤۲۷-۸٤۳٤.

۱٦. Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D. (۲۰۰۷): Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. ۱۰th ed., Saunders, Elsevier, pp: ۱۲٤۵-۱۲٤۸.

۱۷. Sambrook, J. and Russell, D.W. (۲۰۰۱): Molecular cloning :a laboratory manual. ۳th ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp: ۸۷٤-۸۹۵.

۱۸. Tajima, S. and Aida, Y. (۲۰۰۰): The region between amino acids ۲٤۵ and ۲٦۵ of the bovine leukemia virus (BLV) Tax protein restricts transactivation not only via the BLV enhancer but also via other retrovirus enhancers. Journal of Virology, ۷٤(۲۳): ۱۰۹۳۹-۱۰۹٤۹.

۱۹. Tajima, S. and Aida, Y. (۲۰۰۲): Mutant Tax protein from bovine leukemia virus with enhanced ability to activate the expression of c-fos. Journal of Virology, ۷٦(۵): ۲۵۵۷-۲۵٦۲.

۲۰. Tajima, S., Takahashi, M., Takeshima, S.N., Konnai, S., Yin, S.A., Watarai, S., Tanaka, Y., Onuma, M., Okada, K. and Aida, Y. (۲۰۰۳): A mutant form of the Tax protein of bovine leukemia virus (BLV), with enhanced transactivation activity, increases expression and propagation of BLV in vitro but not in vivo. Journal of Virology, ۷۷(۳): ۱۸۹٤-۱۹۰۳.

۲۱. Twizere, J.C., Kerkhofs, P., Burny, A., Portetelle, D., Kettmann, R. and Willems, L. (۲۰۰۰): Discordance between bovine leukemia virus Tax immortalization in vitro and oncogenicity in vivo. Journal of Virology, ۷٤(۲۱): ۹۸۹۵-۹۰۲.

۲۲. Twizere, J.C., Lefèbvre, L., Collete, D., Debacq, C., Urbain, P., Heremans, H., Jauniaux, J.C., Burny, A., Willems, L. and Kettmann, R. (۲۰۰۵): The homeobox protein MSX۲ interacts with Tax oncoproteins and represses their transactivation activity. Journal of Biological Chemistery, ۲۸۰(۳۳): ۲۹۸۰٤-۲۹۸۱۱.

۲۳. Usui, T., Konnai, S., Tajima, S., Watarai, S., Aida, Y., Ohashi, K. and Onuma, M. (۲۰۰۳): Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep. Journal Veterinary Medical Science, ٦۵(۱۱): ۱۲۰۱-۱۲۰۵.

Vet. J. of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch. ۳, ۲:۴۷۷-۴۸۳, ۲۰۰۹

Sequencing and phylogenetic analysis of Bovine Leukosis Virus *Tax* gene in Iran

Momtaz, H.[۱*], Amini, P.[۲], Abbasian, B.[۲]

۱- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord, Shahrekord, Iran
۲-Graduate of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord, Shahrekord, Iran
**Corresponding author's email*: *hamomtaz@yahoo.com*
(Received: ۲۰۰۹/۲/۱۲**, Accepted:** ۲۰۰۹/۱۰/۲۸**)**

Abstract

Bovine Leukosis Virus (BLV) belongs to the genus Deltaretrovirus ,subfamily Orthoretrovirinae of the family Retroviridae comprising ۳ main genes of gag, pol and env and a number of replication regulatory genes such as Tax, Rex, R III, C IV. For determination of genetic relationship of Tax gene of BLV in Iran with those in other countries fragments ۹۲۷bp corresponding to Tax from four infected samples were amplified in PCR system and sequenced for determining nucleotide sequence and compared with identified nucleotide sequence of this gene in other countries.A comparison made on Tax gene in Iran with other countries demonstrated ۳ , ٤ to ۷ , ۷٪ variability in Tax gene, of which the greatest sequence similarity exists between sequences of Tax in Iran with USA (AY۷۰۰۳۷۸ , ۱)with ۹٦ , ٦٪ similarity and the least relationship exists between sequences of this virus in Iran with Australia (AY۷۰۰۳۷۹ , ۱) and Japan (AY۷۰۰۳۸۱ , ۱) with ۹۲ , ۳٪ similarity

Keywords: Bovine Leukosis Virus, *Tax* gene, Phylogenetic relationship, Iran