مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۴، ۴۷۱- ۴۶۳
Journal of Veterinary Research. 71,4:463-471, 2016
Original Article

تعیین هویت مولکولی و شجره شناسی بر اساس ژن نوکلئوکپسید ویروس برونشیت عفونی پرندگان جدا شده از گله‌های گوشتی در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴

وحید کریمی[۱] آرش قلیان چی لنگرودی[۲*] مسعود هاشم زاده[۳] زینب ایمانی زاده[۲]

۱) گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳) موسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج، کرج، ایران

(دریافت مقاله: ۲۲ تیر ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۷ مهر ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: برونشیت عفونی یک بیماری مهم از نظر اقتصادی در ماکیان بوده که به دلیل ظهور ژنوتیپ‌های جدید ویروس برونشیت عفونی، کنترل این بیماری بعنوان یک مشکل جدی در صنعت طیور در دنیا مطرح است و پیش از این، مطالعه جامعی برروری این ژن بر روی ژنوتیپ‌های سال‌های اخیر مختلف کشور انجام نگردیده بود. **هدف:** لزوم از انجام این مطالعه تعیین هویت مولکولی و شجره شناسی بر اساس ژن نوکلئوکپسید ویروس برونشیت عفونی جدا شده از گله‌های گوشتی ایران در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ می‌باشد. **روش کار:** در این بررسی ژن نوکلئو کپسید ده جدایه از چهار نوع ژنوتیپ متفاوت ویروس برونشیت عفونی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر و با نرم افزارهای مناسب شجره شناسی و تعیین ساختار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. **نتایج:** از نظر شجره شناسی ویروس‌های برونشیت عفونی گروه ماساچوست، QX و B/۷۹۳ در گروه خود قرار گرفتند و ژنوتیپ ویروس واریانت ۲ در کنار سایر ویروس‌های جدا شده از ایران قرار داشتند. در صد تشابه بر اساس اسید آمینه، بین سویه‌های مختلف مورد مطالعه بین ۸۹/۹۷ تا ۹۹/۷۵٪ تشابه وجود داشت. بیشترین تشابه بین دو ژنوتیپ IBKG-۱و IBKG-۸ مورد مطالعه در گروه B/۷۹۳ و کمترین تشابه بین دو ژنوتیپ QX و واریانت ۲ (ویروس‌های IBKG-۵ و IBKG-۹) بوده، که این میزان تفاوت برای ژن نوکلئوکپسید (محافظت شده) نسبتاً بالا می‌باشد. بررسی بیوانفورماتیک نشان داد که پروتئین در این ویروس‌ها بین ۶ تا ۷ صفحه بتا و بین ۸ تا ۱۰ مارپیچ آلفا دارند. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند اطلاعات مناسبی در زمینه استفاده از اطلاعات این پروتیئن در تولید پروتئین‌های نو ترکیب جهت تولید کیت‌های الایزا و روش‌های تشخیص سریع، واکسن‌های نو ترکیب و همچنین اپیدمیولوژی مولکولی این بیماری ویروسی مهم در کشور نماید.

واژه‌های کلیدی: نوکلئوکپسید، ویروس برونشیت عفونی پرندگان، تعیین هویت مولکولی، شجره شناسی

مقدمه

برونشیت عفونی (IB) پرندگان یک بیماری بسیار واگیر، حاد و درگیرکننده دستگاه تنفسی فوقانی ماکیان و همچنین دارای اهمیت اقتصادی است. برونشیت عفونی برای اولین بار در ایالات متحده در داکوتای شمالی در سال ۱۹۳۰ مشاهده و نخستین توصیف مستند بیماری توسط Schalk و Hawn در سال ۱۹۳۱ ارائه گردید (۱۱،۱۳). IBV یک گاما کروناویروس در زیر خانواده کرونا ویرینه و خانواده کرونا ویریده است. ژنوم ویروس برونشیت عفونی پرندگان, RNA تک رشته‌ای قطب مثبت است که حدود ۲۸ kb-۲۷/۵ طول دارد. ژنوم در انتهای '۵ دارای کلاهک و در انتهای '۳ واجد دم پلی آدنین و ساختار ویروس شامل زائد گرزی شکل (S)، پروتئین کوچک غشایی (E)، ماتریکس (M) و نوکلئوکپسید (N) است. رشته ژنی RNA با فسفو پروتئین N (۵۰kDa-۶۰ بطول ۴۰۹ اسید آمینه) همراه می‌باشد. نوکلئو کپسید زمانیکه از پارتیکل آزاد می‌شود به شکل یک رشته لوله ای به طول۱۴nm تا ۱۶ به نظر می‌آید. نوکلئوکپسید متعاقباً با پروتئین M در رتیکولوم اندوپلاسم فعل و انفعالی داشته و به این ترتیب پارتیکل ویروس بسته بندی می‌شود. با این‌حال، برخلاف نوکلئوکپسیدهای ویروس‌ها و پارامیکسو ویروس‌ها، پروتئین نوکلئوکپسید کروناویروس‌ها حفاظت برای ژنوم آن‌ها در برابر اثر ریبو نوکلئازها فراهم می‌کند. بخش عمده مونومر پروتئین نوکلئوکپسید از دو ناحیه مستقل شامل ناحیه اتصال به ژنوم پایانه آمینی (از اسید آمینه موقعیت ۲۹ تا ۱۶۰ بطول ۱۳۲ اسید آمینه: NTD) و منطقه دایمریزاسیون C ترمینال (CTD، بطول ۱۰۸ اسید آمینه، از اسید آمینه ۲۲۶ -۳۳۳) می‌باشد. همچنین منطقه غنی از سرین (بطول ۲۶ اسید آمینه، ۱۶۵-۱۹۰) در پروتئین نوکلئوکپسید ویروس‌های برونشیت عفونی پرندگان شناسایی شده است. روش‌های زیادی برای تفریق و دسته بندی جدایه‌های برونشیت عفونی پرندگان استفاده و با هم کاملاً مقایسه شده اند. دسته بندی سروتیپ براساس استفاده از آنتی بادی‌های خنثی کننده و طبقه بندی ژنوتیپ براساس تعیین توالی ژن S۱ است (۶). نواحی نوکلئوکپسید کروناویروس‌ها، تورو ویروس‌ها و آرتری ویروس‌ها یک فسفوپروتئین پایه وابسته به RNA ژنومی می‌باشد که، ساختار نوکلئوکپسید راشکل می‌دهد. بنا به گزارش Seyfi Abad و همکاران در سال ۲۰۰۴ اولین گزارش انجام گردید (۱۶). Vasfi-Marandi و Bozorgmehrifard در سال ۲۰۰۱ برور مطالعه بر روی ویروس‌های برونشیت عفونی طیوردر بین سال‌های ۷۹-۱۳۷۶ از مرغداری‌های صنعتی ایران، حضور واریانت‌هایی از این

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۱۵۴ نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲ Email: ghalyana@ut.ac.ir

ویروس را در کشـور را اثبات نمودند (۱۹). طی مطالعات اخیر ژنوتیپ‌های ماساچوسـت،B/۷۹۳، IS/۱۴۹۴، IS/۷۲۰، IR-۱ و IR-۲ در ایران گزارش شـده اسـت (۱۳،۱۰). در حال حاضر از واکسن‌های زنده گروه ماساچوست (MA۵ و H۱۲۰) و گـروه B/۷۹۳ (۹۱ /۴، IB۸۸ و ۹۶/۱) جهـت کنتـرل بیماری برونشـیت عفونی در مزارع پرورش طیور ایران استفاده می‌گردد. تا کنون مطالعه‌ای جامعی بر روی ژن نوکلئوکپسید ویروس برونشیت عفونی صـورت نپذیرفته بود و هدف از انجام این مطالعه تعیین هویت مولکولی و شجره شناسی بر اساس ژن نوکلئوکپسید ویروس برونشیت عفونی جدا شده از گله‌های گوشتی در سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه‌هـای مـورد مطالعه: درآزمایشـگاه ویروس‌شناسـی دانشـکده دامپزشـکی دانشـگاه تهران تعدادی ویروس برونشـیت عفونی پرندگان ازنمونه‌های بالینی (نای وکلیه،ازگله‌های گوشـتی مشکوک به برونشیت عفونی) در سـال ۱۳۹۳-۱۳۹۴ جدا گردیدند. پس ازتأیید، ژنوتیپ جدایه‌ها براساس ژن اسپایک شناسـایی (اطلاعات اورده نشده است) و جدایه‌های مورد اسـتفاده در این مطالعه براسـاس ژنوتیپ ویروس براساس جدول ۱ انتخاب شدند.

استخراج RNA: اسـتخراج RNA با استفاده ازکیت استخراج RNA شرکت سیناکلون (Cat. No.: PR۸۹۱۶۲۰) طبق دستور العمل سازنده کیت انجام گرفت.

واکنـش رونوشـت بـرداری معکـوس (RT- Reaction): واکنش رونوشت برداری معکوس (RT) با استفاده از کیت ساخت cDNA شرکت فرمنتـاز (Cat No: K۱۶۲۲) و با اسـتفاده از پرایمر تصادفی شـش تایی صورت گرفت.

تکثیـر ژن N بـا اسـتفاده از واکنـش زنجیـره‌ای پلیمـراز (PCR): ژن نوکلئوکپسـید بـا اسـتفاده از پرایمرهـای '۵ GAATTCCCGCGTGTACCTCTCTAGTA '۳ و '۵ GGATCCGCTAAC-TCTATACTAGCCTAT '۳ و با استفاده از مسـتر میکس ۲X (۲X) PCR شرکت سیناکلون (Cat No: PR۸۲۵۲C) تکثیر گردید (۲۰).

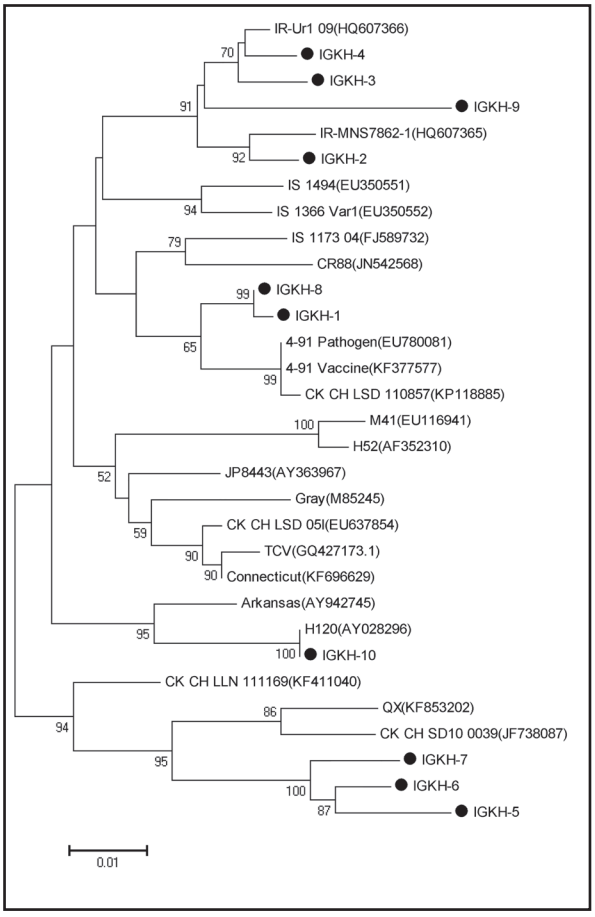
ترسیم درخت شجره شناسـی: محصولات PCR توسط کیت PCR AccuPrep® PCR (Bioneer Co., South Korea) خالـص و توالی یابی با پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR (Bioneer Co., south Korea) انجام گردید. کروماتوگرام‌ها با نرم افزار Finch TV مورد بررسی قرار گرفت و درخت شـجره شناسی با استفاده از نرم افزار MEGA ۵/۱ با اسـتفاده از روش Neighbor-Joining براساس توالی اسیدهای امینه ترسیم گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی اسید آمینه‌ای بدست آمده با چند توالی ژن نوکلئوکپسید ویروس برونشیت عفونی پرندگان منتشر شده از بانک ژن مقایسه گردید (۱۹).

تعیین ساختار ثانویه: با استفاده از توالی اسید آمینه‌های ترجمه شده و با اسـتفاده از پایگاه The PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench (http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred) ساختار دوم پروتئین تعیین گردید.

تعیین مکان‌های متمایل بـه اتصال به RNA: پیش بینی مکان‌هایی که تمایل اتصال به RNA ویروسی داشتند توسط پایگاه BindN (http://bioinfo.ggc.org/bindn/) گردیدند.

نتایج

پس از ارسال قطعه مورد نظر به توالی یابی، ویرایش اطلاعات و ترسیم درخت شـجره شناسی بر اساس اسـید آمینه، از نظر تکاملی ویروس‌های گروه ماساچوسـت، QX و B/۷۹۳ در گروه خود قـرار و ژنوتیپ واریانت ۲ در کنار سایر ویروس‌های جدا شده از ایران قرار داشتند (تصویر ۱). در صد



تصویر ۱. درخت مربوط به مطالعات شـجره شناسـی ویروس‌های برونشـیت عفونی پرندگان (IBV) جدا شده از جوجه‌های گوشتی طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ براساس توالـی اسـیدهای امینه نوکلئوکپسـید. درخت فوق بـا نرم افـزار MEGA۵ با روش بـا روش Neighbor-Joining و ازمون ریشـه‌ای ۱۰۰۰ تکرار ترسـیم شـده اسـت جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه با دایره توپر مشکی مشخص گردیده است.

```
                                   20                                  40                                  60
                                    |                                   |                                   |
     IGKH-1  SAGNASWFQP  IKAKKLNAPQ  PKFEGSGVPD  NENLKPSQQH  GYWRRQHRYK  PGKGGRKPVP  60
     IGKH-2  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  60
     IGKH-3  ..........  ..........  ..........  ..........  .........F.  ..........  60
     IGKH-4  ..........  ..........  ..........  ..........  .........F.  ..........  60
     IGKH-5  .S.......A  L........A  ..........  .....N....  ......A...  Q.........  60
     IGKH-6  .S.......A  L........A  ..........  .....N....  ......A...  Q.........  60
     IGKH-7  .S.......   L........A  ..........  .....N....  ......A...  Q.........  60
     IGKH-8  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  60
     IGKH-9  ..........  ..........  .........G  ..........  ......N.C.  Q......F..  60
    IGKH-10  .S.......A  L......S.P  ..........  .....L....  ......A...  .....K.S..  60
  Consensus  SXGNASWFQP  XKAKKLNAPX  PKFEGSGVPD  NENLKXSQQH  GYWRRQXRYK  XGKGGRKPVP
                                   80                                 100                                 120
                                    |                                   |                                   |
     IGKH-1  DAWYFYYTGT  GPAADLNWGD  NQDGIVWVAA  KGADTKSRSN  QGTRDPDKFD  QYPLRFSDGG  120
     IGKH-2  ..........  ..........  S.........  ....V.....  ..........  ..........  120
     IGKH-3  ..........  ......H...  S.......S.  ....L.....  ..........  ..........  120
     IGKH-4  ..........  ..........  I.......S.  ....F.....  ..........  ..........  120
     IGKH-5  ..........  ..........  S.........  ....V.....  ..........  .F........  120
     IGKH-6  ..........  ..........  S.........  ....V.....  ..........  .F........  120
     IGKH-7  ..........  ..........  S.........  ....V.....  ..........  .F........  120
     IGKH-8  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  ..........  120
     IGKH-9  ...N......  ..........  S.........  ..........  .....S....  ..........  120
    IGKH-10  ..........  ..........  S.......S.  ..........  ..........  ..........  120
  Consensus  DAWYFYYTGT  GPAADLNWGD  SQDGIVWVAA  KGADXKSRSN  QGTRDPDKFD  QYPLRFSDGG

     IGKH-1  PDGNFRWDF|  PI  132
     IGKH-2  ..........  .L  132
     IGKH-3  ..........  .L  132
     IGKH-4  ..........  .L  132
     IGKH-5  ..........  .L  132
     IGKH-6  ..........  .L  132
     IGKH-7  ..........  .L  132
     IGKH-8  ..........  ..  132
     IGKH-9  ..........  .L  132
    IGKH-10  ..........  ..  132
  Consensus  PDGNFRWDF|  PL
```

تصویر ۲. همردیفی توالی‌های اسید آمینه‌ای درمنطقه ناحیه اتصال به ژنوم N ترمینال (از اسید آمینه موقعیت ۲۹ تا ۱۶۰ بطول ۱۳۲ اسید آمینه: NTD) در پروتئین نوکلئوکپسید ویروس‌های برونشیت عفونی پرندگان (IBV) جدا شده از جوجه‌های گوشتی طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴.

```
                                   20                                  40                                  60
                                    |                                   |                                   |
     IGKH-1  RYCKRTVPPG  YKVDQVFGPR  TKGKEGNFGD  DKMNEKGIKD  GRVTAMLNLV  PSSHACLFGS  60
     IGKH-2  ......I...  ...E......  ..........  .....E..R.  ..I.......  ..........  60
     IGKH-3  ..........  ..........  ..........  .....E....  ..........  ..........  60
     IGKH-4  ......I...  ..........  ..........  .....E....  ..........  ..........  60
     IGKH-5  .F....I...  .R........  ..........  .....E....  ..........  .....S.E.  60
     IGKH-6  .F....I...  .R........  ..........  .....E....  ..........  ..........  60
     IGKH-7  .F....I...  .R........  ..........  .....E....  ..........  ..........  60
     IGKH-8  ..........  ..........  ..........  .....E....  ..........  ..........  60
     IGKH-9  ......I...  .R........  ..........  ....DES...  ..........  ..........  60
    IGKH-10  ......I...  ..........  ..........  .....E....  ...I......  ..........  60
  Consensus  RYCKRTIPPG  YXVDQVFGPR  TKGKEGNFGD  DKMNEEGIKD  GRVTAMLNLV  PSSHACLFGS
                                   80                                 100
                                    |                                   |
     IGKH-1  RVTPKLQPDG  LHLKFEFTTV  VPRDDPQFDN  YVKICDQCVD  GVGTRPKD  108
     IGKH-2  ..........  ...R......  ..........  ..........  ........  108
     IGKH-3  ..........  ..V.......  ..........  ..........  ........  108
     IGKH-4  ..........  ..........  ..........  ..........  ........  108
     IGKH-5  .R........  .NW...L...  ..........  ..........  ........  108
     IGKH-6  ..........  ..........  ..........  ..........  ........  108
     IGKH-7  ..........  ..........  ..........  ..........  ........  108
     IGKH-8  ..........  ..........  ..........  ..........  ........  108
     IGKH-9  ..........  ......L...  ..........  ..........  ........  108
    IGKH-10  ..........  ...R......  .S........  ..........  ........  108
  Consensus  RVTPKLQPDG  LHLKFEFTTV  VPRDDPQFDN  YVKICDQCVD  GVGTRPKD
```

تصویر ۳. همردیفی توالی‌های اسید آمینه‌ای منطقه دایمریزاسیون C ترمینال (CTD، بطول ۱۰۸ اسید آمینه، از اسید آمینه ۲۲۶ -۳۳۳) در پروتئین نوکلئوکپسید ویروس‌های برونشیت عفونی پرندگان (IBV) جدا شده از جوجه‌های گوشتی طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴.

```
                                   20
                                    |
     IGKH-1  SGRSTAASSA  ASSRAPSREG  SRGRRS  26
     IGKH-2  ..........  ..........  ......  26
     IGKH-3  ..........  ..........  ......  26
     IGKH-4  ..........  ..........  ......  26
     IGKH-5  ..........  ...TV.....  ......  26
     IGKH-6  ..........  ...TV....R  ......  26
     IGKH-7  ..........  ....V.....  ......  26
     IGKH-8  ..........  ..........  ......  26
     IGKH-9  ...L......  ..........  ......  26
    IGKH-10  ..........  ........D.  ......  26
  Consensus  SGRSTAASSA  ASSRAPSREG  SRGRRS
```

تصویر ۴. همردیفی توالی‌های اسید آمینه‌ای منطقه غنی از سرین (بطول ۲۶ اسید آمینه، ۱۶۵-۱۹۰) در پروتئین نوکلئوکپسید ویروس‌های برونشیت عفونی پرندگان (IBV) جدا شده از جوجه‌های گوشتی طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴.

تشابه بر اساس اسید آمینه بین سویه‌ای مختلف مورد مطالعه بین ۸۹/۹۷ تا ۹۹/۷۵٪ بوده است. همچنین بیشترین تشابه بین دو ژنوتیپ IBKG-۱ و IBKG-۸ مورد مطالعه در گروه B/۷۹۳ بوده و کمترین مشابهت‌ها بین دو ژنوتیپ‌های QX و واریانت ۲ (ویروس‌های IBKG-۵ و IBKG-۹) مشاهده شد، که نسبتاً برای ژن نوکلئوکپسید (N) تقریباً محافظت شده، بالا می‌باشد. ویروس‌های ایرانی این مطالعه در گروه QX دارای شباهت ۹۲/۶۶ تا ۹۳/۶۴ درصدی با پروتوتیپ ویروس QX (KF۸۵۳۲۰۲) بودند. همچنین برای سویه‌های واریانت ۲ جدایه‌های مورد مطالعه با سویه ایرانی UR-۱

```
Sequence:     MASGKATGKSDSPAPIIKLGGPKPPKIGSSGNASWFQALKAKKLNAPAPKFEGSGVPDNE
Prediction:   --+-++++++++-----+---+++++-+++++-------+-++-+-+--+----------
Confidence:   556296979557254686522484792597452237367657746254375232353323

Sequence:     NLKNSQQHGYWRRQARYKQGKGGRKPVPDAWYFYYTGTGPAADLNWGDSQDGIVWVAAKG
Prediction:   --++++++++++++++++++++++++------------+--------------------+-
Confidence:   247656686657884999889779835359659343453244472243256669397863

Sequence:     ADVKSRSNQGTRDPDKFDQFPLRFSDGGPDGNFRWDFIPLNRGRSGRSTAASSAASSTVP
Prediction:   ++-++++++++++--+------+-----+--+--------++++++++++-+++++++--
Confidence:   562889899789522666373947225453246269794849699799952985478822

Sequence:     SREGSRGRRSGAEDDLIARAAKIIQDQQRKGTRITKQKADEMAHRRFCKRTIPPGYRVDQ
Prediction:   ++++++++++--------+--+-----++++++++++---+----+--++---+--+--+
Confidence:   899799799725476878497665242578789578527343542633873425326844

Sequence:     VFGPRTKGKEGNFGDDKMNEEGIKDGRVTAMLNLVPSSHACSFESRRTPKLQPDGLNWKF
Prediction:   ----++++++-+-----------+--+-----------+--+-+++++++-+--------
Confidence:   525287959635443426335575458827794894226527266897783624454637

Sequence:     ELTTVVPRDDPQFDNYVKICDQCVDGVGTRPKDDEPRLKSRPNSRPATRGNSPAPRQQRQ
Prediction:   -------+--------------------+++++++++-+++++++++++++++++++++
Confidence:   674257474532664594997799644279575655838898799969968997999999

Sequence:     KKEKKSKKQEDDVDKALTSDEERNNAQLEFDDEPKVINWGDSALGENEL
Prediction:   ++++++++++-------+++--++--+---------------------
Confidence:   999999975434863755672285345757879838835962566456 8
```

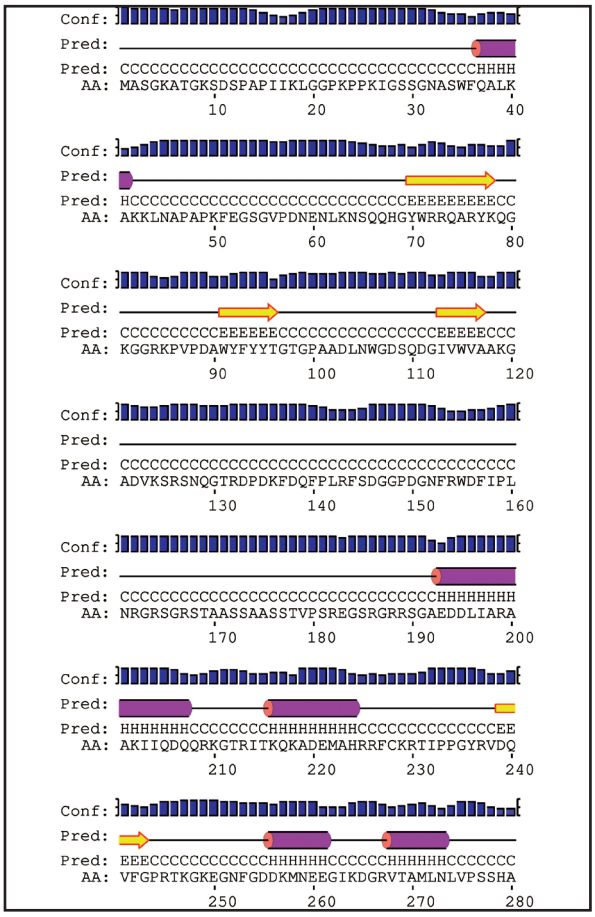
IBKG-5 (QX)
***** Prediction: binding residues are labeled with ‹+› and in red; non-binding residues labeled with ‹-› and in green.**
***** Confidence: from level 0 (lowest) to level 9 (highest).**

تصویر ۵. پیش بینی محل تمایل اتصال نوکلئوکپسید به RNA با استفاده از نرم افزار آنلاین Bind N نشان داده شده در سویه IBKG-۵ (QX) بعنوان مثال آورده شده است.

(HQ ۶۰۷۳۶۵) بین ۲۸/۹۸ تا ۹۹٪ شباهت داشتند. میزان این شباهت با سویه (EU۳۵۰۵۵۲) IS-۱۴۹۴ بین ۹۳ تا ۹۴/۸۶٪ بوده است. میزان شباهت سویه ماساچوست این مطالعه با H۱۲۰ برابر ۱۰۰٪ و همچنین میزان شباهت ویروس‌های گروه B/۷۹۳ با سویه واکسن و بیماریزای ۹۱/۴ برابر با ۹۸/۰۲٪ بوده است. همردیفی توالی‌های اسید آمینه‌ای در منطقه ناحیه اتصال به ژنوم N ترمینال (از اسید آمینه موقعیت ۲۹ تا ۱۶۰ بطول ۱۳۲ اسید آمینه: NTD و منطقه دایمریزاسیون C ترمینال (CTD)، بطول ۱۰۸ اسید آمینه، از اسید آمینه ۲۲۶ -۳۳۳) و منطقه غنی از سرین (بطول ۲۶ اسید آمینه، ۱۶۵-۱۹۰) در پروتئین نوکلئوکپسید بترتیب در تصاویر ۲، ۳و۴ آورده شده و مقایسه شده است. تعداد صفحات بتا (Beta Sheet) و مارپیچ آلفا (Alpha-Helix) در سویه‌های مختلف تخمین زده شد که در جدول ۳ آورده شده است. ویروس‌های مورد مطالعه بین ۶ تا ۸ صفحات بتا و بین ۸ تا ۱۰ مارپیچ آلفا داشتند. ساختار ژنوتیپ QX بعنوان نمونه در تصویر ۶ آورده شده است. نمونه نواحی که دارای اتصال به RNA با ویژگی بالای ۸۰٪ بودند در همه توالی‌های مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت چندانی در چهار ژنوتیپ مورد مطالعه مشاهده نگردید و نواحی متمایل به اتصال به RNA در انتهای N و انتهای C پروتئین وجود داشت.

بحث

ویروس برونشیت عفونی پرندگان در تمامی کشورهایی که صنعت پرورش طیور متراکم دارند، شایع بوده و میزان بروز این نوع عفونت در اکثر مناطق دنیا تا ۱۰۰٪ نیز می‌رسد. ویروس برونشیت عفونی (IBV) می‌تواند موجب ایجادبیماری تنفسی، نارسایی کلیوی و اختلالات تولید مثلی شود. گرچه برخی کشورها دارای تیپ‌های آنتی ژنی مشترک هستند، اما سویه‌های IBV در یک ناحیه جغرافیایی، مثل اروپا، ایالات متحده امریکا و استرالیا منحصر به فرد بوده و لذا ارزیابی برای محدود کردن ورود سویه‌های IBV خارجی به منطقه باید مد نظر قرار گیرد (۷،۸). پروتئین نوکلئوکپسید با ژنوم ویروس همراه است و نقش مهمی در تکثیر ویروس و همچنین تداخل با ایمنی دارد. مستندات اخیر نشان می‌دهد پروتئین نوکلئوکپسید می‌تواند، علاوه بر گلیکوپروتئین S۱، نقش مهمی در پیشگیری از همه گیری‌های برونشیت عفونی داشته باشد (۳). اگرچه پروتئین نوکلئوکپسید در میان کروناویروس‌های مختلف تنوع دارد، اما بین سویه‌های IBV بسیار حفاظت شده است که احتمالاً به علت نقش حیاتی آن در اتصال به RNA و تشکیل ذرات ویروس است. مقایسه آمینواسیدی پروتئین‌های نوکلئوکپسید ویروس‌های برونشیت عفونی مختلف مشخص نمود که آن‌ها دارای تشابه ۷/۸۹ تا ۹۴/۱ ٪ با سویه بودت (Beaudette) می‌باشند.



تصویر ۶. ساختار دوم پروتئین در سویه IBKG-۵ (QX) با استفاده از نرم افزار آنلاین The PSIPRED Protein Sequence Analysis.

پروتئین نوکلئوکپسید می‌تواند به عنوان یک ایمونوژن نقش ایفا کند، و تنها تغییر شناخته شده بعد از ترجمه در مورد آن، فسفوریلاسیون می‌باشد (۱۲). مطالعه ساختاری ویروس برونشیت عفونی و تهیه تابلوی دقیق از ویژگی‌های ویروس موجود کشور مستلزم انجام تحقیقات هدفمند جهت کامل نمودن نقشه ژنتیکی جدایه‌های در حال چرخش در کشور می‌باشد. این مطالعه به منظور توالی یابی ژن نوکلئوکپسید بر روی جدایه‌های برونشیت عفونی ایران صورت گرفت. در این تحقیق ویروس‌های برونشیت عفونی از ژنوتیپ‌های مختلف ایران بر اساس توالی اسید آمینه، در گروه‌های ماساچوست، QX و B/۷۹۳ و واریانت ۲ قرار داشتند. همچنین با توجه به شیوع از انواع تنوع ویروس‌های برونشیت در کشور، تنوع بالایی در این ژن با توجه به ثابت بودن آن دیده می‌شود و نشان داده شده که دارای تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای در سطح اسید آمینه می‌باشد، که این مورد می‌تواند در تشخیص، طراحی واکسن‌های نو ترکیب و مسایل مربوط به ویروس شناسی قابل توجه باشد. William و همکاران در سال ۱۹۹۲ رو ژن‌های نوکلئوکپسید سویه‌های مختلف ویروس برونشیت عفونی و بقیه کروناویروس‌ها مطالعه نمودند. تنوع توالی ژن‌های نوکلئوکپسید سویه‌های Arkansas۹۹، Gray و Holland۵۲ ویروس برونشیت عفونی مشخص شد. توالی نوکلئوتیدی ویروس برونشیت عفونی همه این توالی‌ها بسیار محافظت شده، با شباهت ۹۱/۱٪ تا ۹۶/۵٪ هستند. با این همه دو ناحیه (۱۱۳۸تا۱۱۶۶) و (۸۰۰ تا۳۷۰) که به نظر بیشتر محافظت شده هستند، وجود دارند. درخت شجره شناسی پروتئین نوکلئوکپسید از کروناویروس‌های گوناگون نشان داد که، کروناویروس‌ها به سه گروه آنتی ژنی عمده تقسیم می‌شوند: هرچند، یک درخت شجره شناسی نوکلئوکپسید ویروس برونشیت عفونی، نشان دادکه این‌ها برای گروه‌های آنتی ژنی اختصاصی تیپ IBV صدق نمی‌کند (۲۱). Boursnell وهمکاران در سال ۱۹۸۵ توالی‌های ژن‌های نوکلئوکپسید دو جدایه ویروس برونشیت عفونی پرندگان (Beaudette و M۴۱) را بررسی نمودند. توالی آمینواسید شباهت قابل توجه با نوکلئوکپسیدهای سویه‌های ویروس هپاتیت موش JHM-A۵۹ نشان داد. تفاوت عمده بین توالی‌های معین برای دو سویه IBV ناحیه غیر قابل ترجمه ۳' سویه Beaudette شامل ۱۸۴بازی بود، که در جدایه M۴۱ حاضر نبود (۴). Shieh و همکاران در سال۲۰۰۳ توالی نوکلئوتیدی کامل ژن‌های S۱ و N ویروس برونشیت عفونی جدا شده از ژاپن وتایوان را منتشر کردند. این سویه‌های ژاپنی توالی‌های S۱ مشابه سویه‌های استرالیایی وتوالی‌های N مشابه سویه‌های آمریکای شمالی را دارا بودند. نتایج نشان دهنده این مورد بود که سویه‌های ژاپنی می‌توانند حاصل نوترکیبی ویروس‌های مرتبط با استرالیا وآمریکای شمالی باشند (۱۷). Abreu و همکاران در سال ۲۰۰۶ به آنالیز مولکولی جدایه‌های برونشیت عفونی برزیلی توسط RFLP_RTPCR پرداختند. با استفاده از پروتئین ژن N بعنوان هدف، ویروس برونشیت عفونی توسط RT-PCR/RFLP (توسط آنزیم‌های محدودکننده Hphl, Avall, Sau۹۶۱, Tsp۵۰۹۱) تعیین توالی آنالیز شد. در درخت شجره شناسی، جدایه‌های برزیلی ایجاد یک گروه مجزا نمودند. ترکیب آمینواسیدی پروتئین N از۴۵٪ الی۹۹٪ متغیر بود و در مقایسه با سایر ویروس‌های برونشیت عفونی، تشابه آمینواسیدی از ۴۲٪ الی۹۷٪ بود (۱). مطالعه‌ای توسط Mardani و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی آنالیز مولکولی ژن نوکلئوکپسید و ناحیه غیر ترجمه شده انتهای ۳' دو ویروس برونشیت عفونی جدا شده از مرغداری‌های ایران انجام گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی ژن N و ناحیه UTR ۳' جدایه‌های ویروس برونشیت ایران دارای تشابه ۹۰ درصدی با سویه‌های واکسنی مورد استفاده در مرغداری‌های ایران شامل H۵۲ و H۱۲۰ بودند. اما براساس آنالیزهای شجره شناسی، جدایه‌های ویروسی ایران در گروهی مجزا از سویه‌های واکسنی مورد استفاده در ایران و نیز سویه‌های جدا شده در چین، استرالیا و امریکا قرار گرفتند. با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که ویروس‌های برونشیت عفونی در حال گردش در مرغداری‌های ایران از نظر ژنتیکی از سویه‌های واکسن ویروس که سال‌ها در مرغداری‌های ایران استفاده می‌شوند، مجزا می‌باشند (۲۱). در یک مطالعه‌ای توسط Nosrati و همکاران در سال ۲۰۱۳، توالی‌های آمینواسیدهای سه پروتئین ساختاری S۱، N، M برای پنج جدایه ویروس برونشیت عفونی در ایران در طول

جدول ۱. جدایه‌های مورد استفاده در این مطالعه بر اساس ژنوتیپ ویروس برونشیت عفونی.

ژنوتیپ	اندام نمونه گیری شده	نوع گله	نام جدایه
۷۹۳B	نایی	گوشتی	IBKG-۱
Variant ۲	نایی	گوشتی	IBKG-۲
Variant ۲	کلیه	گوشتی	IBKG-۳
Variant ۲	نایی	گوشتی	IBKG-۴
QX	کلیه	گوشتی	IBKG-۵
QX	نایی	گوشتی	IBKG-۶
QX	نایی	گوشتی	IBKG-۷
۷۹۳B	نایی	گوشتی	IBGK-۸
Variant ۲	کلیه	گوشتی	IBGK-۹
Mass	نایی	گوشتی	IBGK-۱۰

جدول ۲. تعداد صفحات بتا (Beta Sheet) و مارپیچ آلفا (Alpha-Helix) در سویه‌های مختلف ویروس‌های برونشیت عفونی پرندگان (IBV) جدا شده از جوجه‌های گوشتی طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴.

گروه ویروس‌های مورد مطالعه	صفحات بتا (Beta Sheet)	مارپیچ آلفا (Alpha-Helix)
گروه ماساچوست	۶	۱۰
گروه B/۷۹۳	۷	۹
گروه واراینت ۲	۸	۱۰
گروه QX	۶	۸

سال‌های ۱۹۹۸-۲۰۱۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای پروتئین N، بالاترین شباهت بین Ur ۰۹/۱ و آرکانزاس DPI وجود داشت. چهار منطقه حفاظت شده برای پروتئین‌های M و N شناخته شد. نتایج نشان داد که احتمالاً جدایه ویروس برونشیت عفونی پرندگان در کشور از سویه ماساچوست منحرف شده که ممکن است به عنوان سویه واکسن به ایران آورده شده باشد(۱۴) که بنظر نویسندگان تحقیق حاضر بعید بنظر می‌رسد. Akrami و همکاران در سال ۲۰۱۳ در این مطالعه‌ای آزمایش لکه‌گذاری نقطه‌ای براساس پروتئین نوترکیب نوکلئوکپسید ویروس برونشیت عفونی برای تشخیص سرولوژیک برونشیت عفونی پرندگان بهینه سازی نمودند. نتایج نشان می‌دهد که آزمایش لکه‌گذاری نقطه‌ای بهینه شده در این مطالعه یک آزمایش قابل انجام، حساس و اختصاصی است و می‌تواند به عنوان یک جایگزین مناسب برای آزمایش الایزا جهت تشخیص سرولوژیک برونشیت عفونی و پاسخ به واکسن مورد استفاده قرارگیرد (۲). Breslin و همکاران در سال ۱۹۹۹، ژن پروتئین نوکلئوکپسید کروناویروس بوقلمون (TCV) را مورد تجزیه و تحلیل قرار کردند. این پروتئین ویروسی در TCV ۴۰۹ اسید آمینه با جرم مولکولی ۴۵kDa دارد. پروتئین نوکلئوکپسید در کروناویروس بوقلمون بیشتر از ۹۰٪ شباهت اسید آمینه‌ای با توالی‌های پروتئین نوکلئوکپسید برونشیت عفونی و کمتر از ۲۱٪ شباهت با پروتئین نوکلئوکپسید کروناویروس گاوی و ویروس گاستروانتریت قابل انتقال دارد (۵). Seo و همکاران در سال ۱۹۹۷ ثابت کردند که انتهای کربوکسیلی ۱۲۰باقیمانده پلی پپتیدی نوکلئوکپسید ویروس برونشیت عفونی، لمفوسیتTسیتوتوکسیک را کاهش می‌دهد وجوجه‌ها را ازعفونت حاد محافظت می‌کند (۱۵). Lugovskaya و همکاران در سال ۲۰۰۶ آنتی ژن نوترکیب پروتئین نوکلئوکپسیدIBV در ایشریشیا کولی برای تشخیص آنتی بادی‌های اختصاصی ویروس برونشیت عفونی در سرم جوجه‌ها توسط الایزای غیرمستقیم را تولید نمودند. از سنجش ۱۵۲۴ نمونه سرمی، ویژگی و حساسیت تشخیصی الایزای طراحی شده در مقایسه با الایزای کامل از ۸۱ /۹۳٪ تا ۸۷/۳۶٪ تعیین گردید (۱۵). همچنین Han و همکاران در سال۲۰۱۳ روی موضوع نقشه اپی توپ و آنالیزحفاظتی دو اپی توپ خطی B-cell جدید پروتئین نوکلئوکپسید کروناویروس برونشیت عفونی پرندگان مطالعه و بعد از غربالگری، دو اپی توپ B-cell خطی شناسایی نمودند که مرتبط با توالی آمینواسیدی FGPRTK و DLIARAAKI در پروتئین نوکلئو کپسید برونشیت عفونی است (۹).

نتیجه‌گیری کلی: نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند اطلاعات مناسبی در زمینه استفاده از اطلاعات این ژن در تولید پروتئین‌های نو ترکیب جهت تولید کیت الایزای تشخیص و روش‌های تشخیص سریع، واکسن‌های نو ترکیب و همچنین همه گیر شناسی مولکولی این بیماری ویروسی مهم در کشور نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می‌دانند از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در قالب پایان نامه دکتری عمومی (شماره ۱۳/۶/۷۵۰۸۰۱۳) قدردانی نمایند. قسمتی از انجام این طرح تحقیقاتی با استفاده از پژوهانه ۳۹۰۰۷/۲۲ سازمان دامپزشکی کشور صورت گرفته است و بدینوسیله از سازمان دامپزشکی کشور قدردانی می‌گردد. همچنین از همکاری جناب آقای مهندس احمد واحدی و سرکار خانم دکتر نجفی در طول این تحقیق قدردانی و تشکر می‌گردد.

References

1. Abreu, J.T., Resende, J.S., Flatschart, R.B., Folgueras-Flatschart, Á.V., Mendes, A.C.R., Martins, N.R., Silva, C.B., Ferreira, M.C., Resende, M. (2006) Molecular analysis of Brazilian infectious bronchitis field isolates by reverse transcription-polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, and partial sequencing of the N gene. Avian Dis. 50: 494-501.
2. Akrami, H., Hedayati, A., Farshian, M., Haqshenas, G. (2013) Development of a recombinant protein-based dot-blot hybridization assay for the detection of antibody to chicken infectious bronchitis virus. Iranian Journal of Veterinary Research. 14: 350-353.
3. Bande, F., Arshad, S.S., Hair Bejo, M., Moeini, H., Omar, A.R. (2015) Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. J Immunol Res. 2015: 1-12.
4. Boursnell, M., Binns, M., Foulds, I., Brown, T. (1985) Sequences of the nucleocapsid genes from two strains of avian infectious bronchitis virus. J Gen Virol. 66: 573-580.
5. Breslin, J.J., Smith, L.G., Fuller, F.J., Guy, J.S. (1999) Sequence analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid protein gene and 3′ untranslated region identifies the virus as a close relative of infectious bronchitis virus. Virus Res. 65: 187-193.
6. Callison, S.A., Hilt, D.A., Jackwood, M.W. (2005) In vitro analysis of a hammerhead ribozyme targeted to infectious bronchitis virus nucleocapsid mRNA. Avian Dis. 49: 159-163.
7. Cook, J.K., Jackwood, M., Jones, R.C. (2012) The long view: 40 years of infectious bronchitis research. Avian Pathol. 41: 239-50.
8. De Wit, J., Cook, J.K. (2014) Factors influencing the outcome of infectious bronchitis vaccination and challenge experiments. Avian Pathol. 43: 485-497.
9. Han, Z., Zhao, F., Shao, Y., Liu, X., Kong, X., Song, Y., Liu, S. (2013) Fine level epitope mapping and conservation analysis of two novel linear B-cell epitopes of the avian infectious bronchitis coronavirus nucleocapsid protein. Virus Res. 171: 54-64.
10. Hosseini, H., Bozorgmehri Fard, M.H., Charkhkar, S., Morshed, R. (2015) Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis Virus Genotypes in Iran (2010-2014). Avian Dis. 59: 431-5.
11. Jackwood, M.W. (2012) Review of infectious bronchitis virus around the world. Avian Dis. 56: 634-41.
12. Lugovskaya, N., Scherbakov, A., Yakovleva, A., Tsyvanyuk, M., Mudrak, N., Drygin, V., Borisov, A. (2006) Detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus by a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Virolo Methods. 135: 292-296.
13. Najafi, H., Langeroudi, A., Hashemzadeh, M., Karimi, V., Madadgar, O., Ghafouri, S., Maghsoudlo, H., Farahani, R. (2015) Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014-2015. Arch Virol. 161: 53-62.
14. Nosrati, M., Tahmorespoor, M., Nassiry, M. (2013) Genetic analysis of three structural proteins in Iranian infectious bronchitis virus isolate. Iranian J Appl Anim Sci. 3: 617-623.
15. Seo, S.H., Wang, L., Smith, R., Collisson, E. W. (1997) The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. J Virol. 71: 7889-94.
16. Seyfi Abad Shapouri, M., Mayahi, M., Assasi, K., Charkhkar, S. (2004) A survey of the prevalence of infectious bronchitis virus type 4/91 in Iran. Acta Vet Hung. 52: 163-166.
17. Sheih, H.K., Shein, J.-H., Chou, H.-Y., Shimizhu, Y., Chen, J.-N., Chang, P.-C. (2004) Complete nucleotide sequences of S1 and N genes of infectious bronchitis virus isolated in Japan and Taiwan. Journal Vet Med Sci. 66: 555-558.
18. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and

maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28: 2731-9.

19. Vasfi-Marandi, M., Bozorgmehrifard, M. (2001) Isolation and identification of infectious bronchitis viruses in chickens between 1997-2000 in Iran . J Facul Vet Med Uni. 56: 119-124.
20. Williams, A.K., Li, W., Sneed, L.W., Collisson, E.W. (1992) Comparative analyses of the nucleocapsid genes of several strains of infectious bronchitis virus and other coronaviruses. Virus Res. 25: 213-222.
21. Mardani, K., Morshedi, A., Talebi, A., Vasfi Marandi, M. (2011) Molecular analysis of the nucleocapsid gene and 3'untranslated region of two infectious Bronchitis Virus field isolates from Iranian poultry farms. Iranian J Vet Med. 5: 53-58.

Molecular characterization and phylogenetic study base on nucleocapsid gene of avian infectious bronchitis viruses isolated from broiler farms, 2014-2015

Karimi, V.[1], Ghalyanchilangeroudi, A.[2*], Hashemzadeh, M.[3], Imanizadeh, Z.[2]

[1]*Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3]*Department of Research and Production of Poultry Viral Vaccines, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran*

(Received 12 July 2016, Accepted 28 September 2016)

Abstract:

BACKGROUND: Avian infectious bronchitis (IB) is an economically important poultry disease. The emergence of new infectious bronchitis virus genotypes has complicated IB control programs. **OBJECTIVES:** This is the first comprehensive molecular analysis of the Nucleocapsid (N) gene of Iranian IBVs. **METHODS:** The nucleocapsid gene of ten IBV isolates (which belonges to four different genotypes) was amplified using specific primers. The phylogenetic trees were constructed based on nucleotide and amino acid sequences of "N" gene. **RESULTS:** IBV genotyping based on "N" gene showed similar IBV classification which was obtained from spike gene analysis and ten isolates belonged to Massachusetts, QX, 793/B and Variant-2 genotypes. Different strains had 89.97- 99.75% homology in their amino acid sequences. The highest nucleotide sequence similarity was observed between IBKG-1 and IBKG-8 (793/B type IBVs), while the lowest was seen between IBKG-5 and IBKG-9 (QX- type and Variant-2 type) IBV isolates. This low similarity is of an interest because the N protein is highly conserved among different IBV strains. "N" Protein structural analysis revealed that the isolates has 8to 10 alpha helices and 6 to 8 beta sheets. **CONCLUSIONS:** The present study provided basic information to develop recombinant nucleocapsid proteins that are applicable in rapid diagnostic tests and ELISA and recombinant vaccines.

Keyword: avian Infectious bronchitis, nucleocapcid, phylogenetic study, characterization

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Phylogenetic tree of infectious bronchitis virus isolates from broiler chickens during the years 1393-1394 based on the amino acid sequence of the nucleocapsid.

Figure 2. Alignment of amino acid sequences of the DNA binding domain in the N-terminal (amino acid position 29 to 160 amino acids in length 132: NTD) in the viral nucleocapsid protein of avian infectious bronchitis (IBV).

Figure 3. Alignment of amino acid sequences of C-terminus of dimerization region (CTD, a length of 108 amino acids, amino acid 226 -333) in the viral nucleocapsid protein of avian infectious bronchitis (IBV) isolates from broiler chickens during the years 1393-1394.

Figure 4. Alignment of amino acid sequences of serine rich region (length of 26 amino acids, 165-190) in the viral nucleocapsid protein of avian infectious bronchitis (IBV) isolates from broiler chickens during the years 1393-1394.

Figure 5. Predict the location of the nucleocapsid binding affinity for RNA using the online application Bind N shown in the way IBKG-5 (QX) is given as an example.

Figure 6. Secondary structure of Nucleocapsid protein in IBKG-5(QX) IBV isolate e using online software (The PSIPRED Protein Sequence Analysis).

Table 1. Isolates used in this study based on infectious bronchitis virus genotype.

Table 2. Number of beta sheets and alpha helix on different strains of avian infectious bronchitis virus (IBV) isolates.

***Corresponding author's email: ghalyana@ut.ac.ir, Tel: 021-61117154, Fax: 021-66933222**