

بررسی توالی پروتئینی جدایه‌های مختلف ویروس برونشیت عفونی ایران با تجزیه فیلوژنی

مریم نصرتی^{۱*}، مجتبی طهمورث پور^۱

^۱ دانشجوی دکتری و ^۱ دانشیار رشته ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشگاه فردوسی مشهد

مشهد- میدان آزادی- پردیس دانشگاه فردوسی - گروه علوم دامی- دانشکده کشاورزی - صندوق پستی ۹۱۷۷۵-۱۱۶۳

Mehraveh58@yahoo.com

چکیده

بیماری برونشیت عفونی طیور یک بیماری مسری در جوجه‌های جوان است که علی‌رغم واکسیناسیون علیه آن گزارشاتی از شیوع و ظهور ویروس جدید این بیماری در کشور مشاهده می‌شود. در این پژوهش توالی پروتئینی زیر واحد S1 ژن S از ۱۳ سویه رفرنس با ۱۵ جدایه ایرانی بدست آمده از بانک ژن مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. توالی‌های مورد بررسی با نرم افزار BioEdit همردیفی و ویرایش شد. ترسیم درخت فیلوژنی با نرم افزار MEGA4 و با استفاده از روش اتصال همسایه با ۱۰۰۰ Bootstrap ترسیم شد. نواحی بسیار متغییر در فاصله ۱۰۵-۵۶، ۱۴۰-۱۲۵ و ۳۰۷-۲۹۰ مشخص گردید. ناحیه حفاظت شده در فاصله اسیدهای آمینه ۲۴۲ تا ۲۵۶ شناسایی شد. با ترسیم درخت فیلوژنی این ۲۴ سویه/جدایه به چهار خوشه اصلی IR-I, IR-II, IR-III, china, تقسیم شد. جدایه‌های IRFIBV(6,7,13,13b,20 & 31) در گروه استرالیایی (IR-I) و جدایه IRFIBV44 در گروه ماساچوست (IR-II) و جدایه‌های (IR-III) و جدایه‌های (IR-1062-GA, IR-1061-PH, IRFIBV(32, 35, 36, 41 & 43) و IR-3654-VM در گروه اروپایی (IR-III) خوشه‌بندی شد. تشابه بین جدایه‌های مختلف ایران بین ۷۰-۹۹٪ بود که حداکثر آن (۹۹٪) بین جدایه‌های IR-1061-PH و IR-1062-GA و حداقل آن (۷۰٪) بین سویه IR-3654-VM و IRFIBV44 بود. تشابه اغلب جدایه‌های ایرانی با سویه‌های ماساچوست ۷۳-۷۰٪ بود. تشابه بین جدایه‌های ایران با سویه های استرالیایی ۷۹-۷۲٪ و با سویه‌های اروپا ۹۰-۸۹٪ بود. به نظر می‌رسد عدم کارایی کامل واکسن در پیشگیری از شیوع بیماری می‌تواند بدلیل همولوژی پایین بین جدایه‌های ایران و سویه‌های تجاری واکسن و یا ایجاد ویروس جدید در اثر نوترکیبی و جهش باشد.

کلمات کلیدی: ویروس برونشیت عفونی، توالی پروتئین، درخت فیلوژنی، همولوژی

مقدمه:

بیماری برونشیت عفونی طیور یک بیماری مسری در جوجه‌های جوان است که در سال ۱۹۳۱ برای اولین بار در ایالات متحده آمریکا شناسایی شد (۵). هر ساله این ویروس خسارات اقتصادی فراوانی به صنعت مرغداری وارد می‌کند و علی‌رغم واکسیناسیون شیوع آن مشاهده می‌شود (۲). ویروس برونشیت عفونی متعلق به خانواده کروناویریده می‌باشد که ژنوم آن یک RNA تک رشته‌ای به طول ۲۷۰۰۰-۳۲۰۰۰ کیلو باز است. دو دسته ژن در ساختار آن مشاهده می‌شود، دسته اول شامل ژنهای ۳ و ۵ است که در ارتباط با همانندسازی و نسخه‌برداری در ژنوم خود ویروس است، دسته دوم ژنهای ساختاری را شامل می‌شود که تولید چهار پروتئین مهم به نام نوکلئوکپسید N، گلیکوپروتئین غشایی M، پروتئین کوچک E که همان ناحیه ۳C است و گلیکوپروتئین سطحی S می‌کنند (۱۰، ۳). گلیکوپروتئین سطحی S یک پروتئین دایمر یا تریمر است که در اثر

تغییرات پس از ترجمه توسط پروتئازهای داخل سلولی به دو زیر واحد S1 و S2 تبدیل می‌شود. زیر واحد S1 باعث اتصال ویروس به گیرنده‌های سلول میزبان می‌شود (۱۰). این زیر واحد بطور مستقیم در عفونت‌زایی ویروس موثر است و در واقع ویروسی که فاقد ناحیه S1 باشد قادر به ایجاد بیماری نیست (۱۳). توالی این زیر واحد برای هر ویروس اختصاصی است و سروتیپ‌های مختلف در اثر حذف، اضافه، جهش و یا نوترکیبی در زیر واحد S1 بوجود می‌آیند. ۲-۳٪ تغییر در توالی اسید آمینه‌های ناحیه S1 (۱۵-۱۰ اسید آمینه) منجر به تغییر سروتیپ می‌شود (۷). لذا این ناحیه می‌تواند مبنای خوبی برای تقسیم بندی سروتیپ‌ها و واریانت‌های مختلف باشد. از این رو اکثر مطالعات آنالیز ژنوم ویروس برونشیت عفونی، بر روی ساختار و نحوه تغییر توالی اسیدهای آمینه زیر واحد S1 صورت می‌گیرد. لذا در این پژوهش با هدف بررسی نحوه اشتقاق جدایه‌های ایرانی در روند تکامل ویروس برونشیت عفونی، توالی اسید آمینه زیر واحد S1 جدایه‌های شناسایی شده در ایران با برخی توالی‌های مرجع ثبت شده در بانک جهانی ژن مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روشها

در این پژوهش توالی اسید آمینه‌های زیر واحد S1 گلیکوپروتئین سطحی S از ۱۳ سویه رفرنس که در بانک جهانی ژن NCBI ثبت شده بود با توالی ۱۵ جدایه ایرانی مورد مقایسه قرار گرفت. توالی‌های مورد استفاده، محل جغرافیای آن، شماره ژن بانک و سایر مشخصات آنها در جدول ۱ آورده شده است. در این توالی‌های، اسیدهای آمینه ۱ تا ۳۶۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی‌های بزرگتر کوتاه شد. پس از همدردی با نرم افزار BioEdit ver 7.0.4.1 درخت فیلوژنی با نرم افزار MEGA4 و با استفاده از روش اتصال همسایه با ۱۰۰۰ Bootstrap ترسیم شد. نواحی حفاظت شده، بسیار متغیر و ماتریس تشابه با نرم افزار BioEdit تعیین شد.

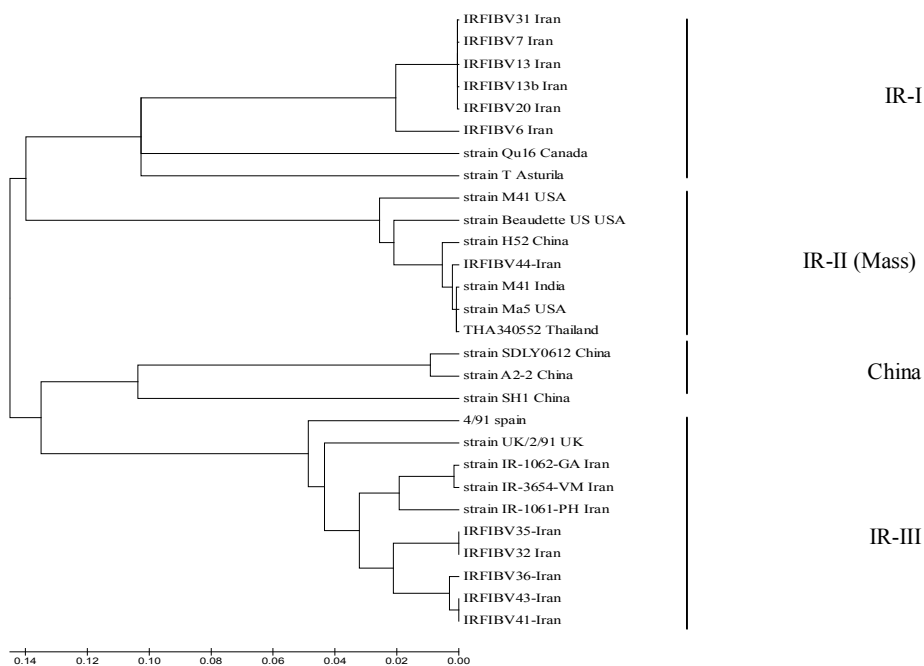
جدول ۱. توالی مورد مطالعه

سویه/ایزوله	سروتیپ	محل	شماره ژن بانک	سویه/ایزوله	سروتیپ	محل	شماره ژن بانک
Beaudette	-----	امریکا	CAC39300.1	H52		چین	AAK27168.1
THA340552	-----	تایلند	ACX48996.1	Qu16		کانادا	AAK31164.1
IRFIBV43	-----	ایران	ADW11184.	IR-1061-PH	793/B	ایران	AAS48626
IRFIBV44	-----	ایران	ADW11185.1	IR-1062-GA	793/B	ایران	AAS48625
IRFIBV41	-----	ایران	ADW11182.1	IR-3654-VM	793/B	ایران	AAS48624
IRFIBV36	-----	ایران	ADW11181.1	M41	Massachusetts	آمریکا	AAS67645.1
IRFIBV35	-----	ایران	ADW11180.1	Ma5	Massachusetts	آمریکا	AAS67647.1
IRFIBV32	-----	ایران	ADW11179.1	T	-----	استرالیا	AAV52771.1
IRFIBV20	-----	ایران	ADW11177.1	SH1	-----	چین	AAV87120.1
IRFIBV31	-----	ایران	ADW11178.1	Spain/00/336	4/91	اسپانیا	ABD36576.1
IRFIBV13b	-----	ایران	ADW11173.1	SDLY0612	H120	چین	ACF71457.1
IRFIBV13	-----	ایران	ADW11172.1	M41	Massachusetts	هندوستان	ACS92639.1
IRFIBV6	-----	ایران	ADW11167.1	A2-2	-----	چین	ADH04625.1
IRFIBV7	-----	ایران	ADW11168.1	UK/2/91	793/B	انگلیس	CAB06306.1

نتایج و بحث:

با وجود واکسیناسیون بر علیه ویروس برونشیت عفونی این ویروس مدام در حال گسترش است. این گسترش اغلب در ارتباط با سویه‌های است که به لحاظ سرولوژیکی با سویه مورد استفاده در واکسن متفاوت هستند (۱۳). اولین بار تفاوت بین سروتیپ‌ها و گروه‌های سرولوژیکی با انگشتنگاری RNA آغاز شد (۴). پس از آن اولین آنالیزهای ژنوم با استفاده از ترسیم درخت

فیلوژنی انجام شد (۸). بدلیل عدم وجود خاصیت تصحیح کنندگی در آنزیم RNA پلیمراز جهش های نقطه به میزان زیادی در ژنوم ویروس اتفاق می افتد تغییرات در مقیاس بزرگتر در اثر نوترکیبی بوجود می آید (۶). به نظر می رسد این تغییرات برای بقاء ویروس ضروری است (۹). ترسیم درخت فیلوژنی توالی های بدست آمده چهار گروه اصلی را نشان داد که بطور کلی برای سویه های ایران سه کلاس مختلف شناسایی شد (IR-I, IR-II, IR-III). کلاس IR-I که ۵ ایزوله و یک سویه ایرانی در آن قرار می گیرد دارای خصوصیتی مشابه سویه استرالیایی است. در بین ایزوله ها و سویه های ایرانی فقط ایزوله IRFIBV44 در دسته ماساچوست قرار گرفت (IR-II). کلاس سوم شامل ایزوله های چین بود و کلاس IR-III مربوط به پنج ایزوله و سه سویه ایرانی است که در دسته سویه های اروپایی قرار گرفت. ماتریس تشابه نشان داد که ویروس های گروه استرالیا بین ۲-۲۲٪ اختلاف ژنتیکی دارند، همولوژی بین سویه T و Qu16 با جدایه های ایران ۷۸-۷۶٪ است. گروه ماساچوست تنها ۴-۱٪ اختلاف ژنتیکی دارند و تشابه توالی های آن با جدایه های ایران بجز با IRFIBV44 ۷۳-۷۰٪ بود. تشابه بین ایزوله IRFIBV44 و سویه ماساچوست بیشترین بود (۹۹-۹۵٪). در حال حاضر بیشتر واکسن های مورد استفاده برای پیشگیری از بیماری برونشیت عفونی مربوط به سویه های H52, M41 و H120 می باشد (۱۳) لذا ممکن است ایزوله IRFIBV44-Iran در اثر واکسیناسیون و نوترکیبی ناشی از آن بوجود آمده باشد. اما در مورد سایر سویه ها به نظر می رسد بدلیل تشابه پایین بین سویه های Mass و جدایه های ایران تزریق واکسن نقش زیادی در کنترل بیماری نداشته است. در کلاس IR-III تشابه بین کلیه جدایه های ایران با Spain/00/336 و UK/2/91 بین ۹۰-۸۹٪ بود. به نظر می رسد برخی ایزوله های ایران در اثر جهش در سروتیپ ۴/۹۱ بوجود آمده است که برخی گزارشات آن را تایید می کند (۱۰). علاوه بر این سروتیپ 793/B مربوط به سویه های اروپایی اولین بار در سال ۱۹۹۱ در بریتانیا گزارش شد که در اثر واکسیناسیون با سویه ماساچوست بوجود آمده بود. پس از آن به سمت آسیای شرقی، مکزیک و بسیاری از کشورها گسترش یافت. امروزه شایع ترین سروتیپ پس از ماساچوست است. این سویه اولین بار در ایران در سال ۱۳۷۷ در اطراف کرج شناسایی شد (۱). سه ناحیه بسیار متغیر در حد فاصل اسید آمینه ۵-۱۰۵، ۱۴۰-۱۲۵ و ۳۰۷-۲۹۰ شناسایی شد. گزارشات متفاوتی در این زمینه وجود دارد (۱۲،۳). تنوع در این ناحیه با تنوع در اپی توپ ها و احتمالا تغییر در تاخودگی پروتئین مرتبط است. سویه هایی که به لحاظ ژنتیکی نزدیک ولی به لحاظ آنتی ژنی با هم فاصله دارند در این ناحیه متفاوتند. علی رغم تفاوت در ناحیه بسیار متغیر پنج سیستمین و ۴ منطقه گلیکوزیل در این توالی حفاظت شده است (۱۲). یک ناحیه حفاظت شده به طول ۱۵ اسید آمینه (GLLACQYN TGNFSDG) در فاصله اسید آمینه ۲۴۲ تا ۲۵۶ از ابتدای پروتئین شناسایی شد. این ناحیه احتمالا در ارتباط با ناحیه اتصال به سلول میزبان در پروتئین است. با سایر مطالعات مطابقت دارد (۸). به طور کلی به نظر می رسد علت شیوع بیماری با وجود واکسیناسیون مداوم می تواند بدلیل تشابه کم بین سویه های و ایزوله های ایرانی با سویه های واکسن باشد علاوه بر این جهش و نوترکیبی می تواند باعث بوجود آمدن سویه های جدید شود که مطابق با سویه های واکسیناسیون نمی باشد. لذا با عنایت به اینکه میزان تشابه در اثر بخشی واکسن موثر است. پیشنهاد می گردد از سویه ها و ایزوله های گروه IR-I و IR-III نیز در تولید واکسن استفاده شود.





Reference

1. **Akbari azad, G. M, Marandi, H, Kivani, 1382.** Isolation and molecular investigation of avian infection bronchio virused in poltry farm of Iran. Iranian journal of veterinary research.59(3).259-264
2. **Cavanagh, D. 2003.** Sever acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. Avian Pathology 32:567-582
3. **Cavanagh, D., P. J. Davis, A. P. A. Mockett, 1988.** Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. Virus Res. 11, 141–150
4. **Clewley, J.P., J. Morser, R. J. Avery, and B. Lomniczi, 1981** Oligonucleotide fingerprinting of the RNA of different strains of infectious bronchitis virus. Infect. Immun. 32, 1227-1233.
5. **Haqshenas, G., K. Assasi, and H. Akrami. 2005.** Isolation and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolate Shiraz3. IBV, by RT-PCR and restriction enzyme analysis. Iranian Journal of Veterinary Research, 6(2),9-15
6. **Holland, J., K. Spindler, F. Horodyski, E. Grabau, S. Nichol, and S. VandePol, 1982.** Rapid evolution of RNA genomes. Science 215, 1577-1585.
7. **Indi Dharmayanti, N.L.P, R. Indriani, and R. Darminto. 2008.** Comparison of sequences of hyper-variable region of subunit s-1 gene of field isolate i-37 infectious bronchitis virus with connecticut serotype 461. Indonesian journal of agriculture 1(2),115-120
8. **Kusters, J.G., H.G.M. Niesters, J. A. Lenstra, M. C. Horzinek, and B. A. M. Van Der Zeijst. 1989.** Phylogeny of antigenic variants of avian Coronavirus IBV. Virology 169, 217-221
9. **Lai, M.M.C. 1992.** RNA recombination in animal and plant viruses. Microbial. Rev. 56, 61-79.
10. **Li, L., C. Xue, F. Chen, J. Qin, Q. Xie, Y. B. Yongchang Cao., 2010.** Isolation and genetic analysis revealed no predominant new strains of avian infectious bronchitis virus circulating in South China during 2004–2008. Veterinary Microbiology 143,145–154
11. **Nouri, A., K. Assasi, M. R. Seyfi-abad Shapouri, 2003.** Field study of infectious bronchitis virus in broiler using type-specific RT-PCR. Arch. Razi. 55:
12. **Wang, C.H., Y. C. Huang, 2000.** Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. Arch. Virol. 145, 291–300.
13. **Xu, C. J. Zhao, X. Hu, G. Zhang. 2007.** Isolation and identification of four infectious bronchitis virus strains in China and analyses of their S1 glycoprotein gene Veterinary Microbiology 122, 61–71



The investigation of protein sequence for infectious bronchitis virus isolate of Iran

Maryam Nosrati^{1*}, Mojtaba Tahmorspoor¹

¹Department of animal science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran. P. B. Box 91775-1163

Mehraveh58@yahoo.com

Abstract

Infectious bronchitis is a contagious respiratory disease in fowl that In spite of the routine use of vaccines, outbreaks continue to occur. The amino acids sequence of S1 for 13 IBV strains was published in Genbank, have been compared with 15 isolate from Iran. The sequences were aligned by Bioedit ver 7.0.4.1 and conserve & variable region and identity matrix were determined. The phylogenetic tree was obtained by using the neighbor-joining method within MEGA4 with 1,000 bootstrapping replicates. One conserves region for S1 proteins was found in 242-256 residue and three hypervariable regions in 56-105, 124-140 and 290-370 residues from first was determined. In phylogeny analysis 4 clusters was recognize. IRFIBV44 Iranian isolate was with Mass serotype in same cluster and IRFIBV (6, 7, 13, 13b, 20 & 31) was in Australia group. The other IBV isolate from Iran, was in Europe group. The Similarity among Iran isolate was 70-99%. The highest was between IR-1061-PH & IR-1062-GA. The similarity of Iran isolate with Mass type, Europe and Australia was 70-73%, 89-90% and 72-79% respectively. it seem that low similarity among Iran isolate and vaccine strain cause the infections bronchitis disease be outbreak in spite of vaccination in the farm of country.

Keyword: infectious bronchitis virus, protein sequence, phylogeny tree, similarity