٥٤٩

١٠٩٨١١

۸۷/۱/۱۰۶۲۹
۸۷/۱۲/٤

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم دامی- اصلاح نژاد دام

کلونینگ و توالی یابی ژن 3B تحت تیپ نوپدید سروتایپ A ویروس بیماری تب برفکی جدا شده از ایران

صابر جلوخانی نیارکی

اساتید راهنما

دکتر مرتضی دلیری دکتر مجید اسماعیل زاده

استاد مشاور

دکتر رسول واعظ ترشیزی

۱۳۸۷/۱۱/۱

پاییز ۱۳۸۷

۱۰۹۸۱۱

تایید اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیأت داوران نسخه ی نهائی پایان نامه آقای صابر جلوخانی نیارکی تحت عنوان "کلونینگ و توالی یابی ژن 3B تحت تیپ نوپدید سروتایپ A ویروس بیماری تب برفکی جدا شده از ایران" را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه ی علمی	امضاء
۱- استاد راهنما اول	**دکتر مرتضی دلیری**	**استادیار**	
۲- استاد راهنما دوم	**دکتر مجید اسماعیل زاده**	مربی پایه ۷	
۳- استاد مشاور	**دکتر رسول واعظ ترشیزی**	**استادیار**	
۴- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	**دکتر علی اکبر مسعودی**	**استادیار**	
۵- اساتید ناظر: ۱-	**دکتر علی اکبر مسعودی**	**استادیار**	
۲-	**دکتر احمد رضا جباری**	**استادیار**	

بسمه تعالی

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه(رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه(رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

مادّه ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اطلاع دهد.

مادّه ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان نامهٔ کارشناسی ارشد نگارنده در رشته **علوم دامی- اصلاح نژاد دام** است که در سال **۱۳۸۷** در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی آقایان **دکتر مرتضی دلیری و دکتر مجید اسماعیل زاده** و مشاورهٔ جناب آقای **دکتر رسول واعظ ترشیزی** از آن دفاع شده است"

مادّه ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّه ۴ در صورت عدم رعایت مادّه ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادّه ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّه ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّه ۶ اینجانب **صابر جلوخانی نیارکی** دانشجوی رشته **علوم دامی- اصلاح نژاد دام** مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: صابر جلوخانی نیارکی

تاریخ و امضاء:

۱۳۸۷/۹/۱۸

نی از تو حیات جاودان می خواهم
نی عیش و تنعم جهان می خواهم
نی کام دل و راحت جان می خواهم
هر چیست رضای تو آن می خواهم

الهی، یکتای بی همتایی، قیوم توانایی، بر همه چیز بینایی، در همه حال دانایی، از عیب مصفایی، از شرک مبرایی، اصل هر دوایی، داروی دلهایی، شاهنشاه و فرمانروایی، مغزز به تاج کبریایی، به تو رسد ملک خدایی.

خواجه عبدالله انصاری

تقدیم به :

✸روح پدری که هرگز او را لمس نکرده، ولی چراغ روشنایی علوم خویش را به منظور هموار نمودن مسیر پر افتخار علم برایم به یادگار گذاشته است

✸روح برادر سخت کوشم، که با بازوهای پرتوان تمام مسؤلیت های زندگی را بر دوش خویش حمل می کرد

✸مادری که تمام عمر خویش را فدای سرنوشتم کرده و همیشه سعی کرده است که فضای خالی پدر را به بهترین نحو ممکن پر کند

✸برادر و خواهر مهربان و دوست داشتنی ام، که محیطی گرم و آرام را در طی مدت تحصیل برایم فراهم کرده اند تا قطره ایی باشم در اقیانوس دانش

✸روح بلند و پرآوازه شهدا که اگر خون رنگین آنها نبود، یقیناً انجام این مطالعه میسر نمی شد

✸به تمامی پویندگان علم و ادب که گام های مثبتی در مسیر پیشرفت علم و کشور بر می دارند

تشکر و قدردانی

حمد و سپاس بی کران خداوندی را که بشر را علم نوشتن به قلم آموخت و به انسان آنچه نمی دانست به الهام خود تعلیم داد. بعد از تواضع در برابر آستان معلای خالق متعال، برخود لازم می دانم که از استاد و برادر عزیزم جناب آقای دکتر-مجید اسماعیل زاده کمال سپاس و تشکر را داشته باشم. راهنمایی های پر لطف و دلسوزانه ایشان همواره مرا در انجام مطالعات تحقیقاتی و امور روزمره ام یاری کرده است. یقین دارم که بدون راهنمایی های ایشان، انجام این طرح تحقیقاتی میسر نبود.

از استاد بزرگوار، جناب آقای دکتر مرتضی دلیری که با تلاش و زحمات بی دریغ، مرا راهنما بودند، بسیار سپاسگذارم.

از استاد مدیر و مدبر جناب آقای دکتر رسول واعظ ترشیزی که افتخار شاگردی ایشان نصیبم گشته است، کمال امتنان را دارم. مشاوره های دلسوزانه و اندیشمندانه ایشان مسیر انجام پایان نامه را برای اینجانب هموار ساخت.

از اساتید عالیقدر جناب آقای دکتر مسعودی و جناب آقای دکتر جباری که قبول زحمت فرمودند و داوری پایان نامه را بر عهده گرفتند سپاسگذارم.

همچنین مراتب قدردانی خود را به آقایان و خانم ها دکتر ابوالقاسم صادقی نیارکی، دکتر کامران اکبری، دکتر زربخت انصاری، دکتر علی میرجلیلی، دکتر خسرو آقایی پور، دکتر محمود ابراهیمی، آقای اعتمادی، خانم هاشمی، خانم صفویه، خانم انتظاری ملکی، خانم تیمورپور و خانم قربانی اظهار می دارم.

از اساتید گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس و کلیه پرسنل بخش بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کمال تشکر و سپاس را دارم.

صابر جلوخانی نیارکی

آذر ۱۳۸۷

چکیده فارسی

سروتایپ A ویروس بیماری تب برفکی در بین هفت سروتایپ، بیشترین تنوع را دارد و تحت تیپ های زیادی را در بر می گیرد. لذا مطالعه مولکولی ژنوم تحت تیپ A نوپدید ضروری به نظر می رسد. در این تحقیق، RNA ویروسی از ویروس تحت تیپ A-05-Iran نوپدید جدا شده در سال ۲۰۰۵ که بر روی سلول BHK21 کشت داده شده بود، تخلیص گردید و واکنش RT-PCR به منظور جداسازی و تکثیر ناحیه ژنی 3ABC انجام شد. محصول PCR خالص سازی شد و در داخل وکتور PNTZ57T با هدف توالی یابی کلون گردید. سپس، پلاسمیدهای حاوی قطعه ژنی هدف، مورد تخلیص قرار گرفتند. توالی یابی ژن مورد نظر با پرایمر پروموتر T7 توسط شرکت MWG انجام شد. توالی ژن 3B بدست آمده از ویروس مورد مطالعه، با پنجاه و سه توالی ژن 3B قابل دسترس در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن برای این ویروس مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که ایزوله A-05-Iran با ایزوله AIRN2005_WRL جدا شده از کشور ترکیه در سال ۲۰۰۵ بیشترین شباهت (۹۸/۶٪) را دارد. همچنین شباهت بین ایزوله A-05-Iran با ایزوله های پاکستان نیز تقریباً ۹۷ درصد بود. بر طبق مقایسه انجام شده می توان نتیجه گرفت که ایزوله مورد مطالعه، در حال گردش در کشور های منطقه است. شباهت نوکلئوتیدی ناحیه 3B ایزوله های عراق (A22) با ایزوله مورد مطالعه تقریباً برابر با ۸۸/۷ درصد بود. میزان این شباهت، پیشنهاد می کند که این ایزوله ها متعلق به ژنوتیپ های متفاوت می باشند. در این مقایسه، A-05-Iran شباهت کمی را با airan-iso105 (۹۰/۱٪) گزارش شده از ایران در سال ۱۹۸۸ نشان داد. همچنین در مقایسه بین سروتایپ ها، A-05-Iran شباهت کمی با سروتایپ های SAT-3 (۶۶/۵٪)، SAT-2 (۷۰ ٪) و SAT-1 (۸۶/۹٪) از کشور آفریقای جنوبی و شباهت نسبتاً زیادی با سروتایپ های Asia1-1 از کشور پاکستان (۹۲ ٪) و C از کشور برزیل(۹۱/۵٪) داشت. در بین هفت سروتایپ مقایسه شده برای ناحیه ژنی 3B، تیپ O جدا شده از ایران فاصله ژنتیکی معنی داری (۹۰/۶٪) را با تحت تیپ نو پدید نشان داد. به طور کلی می توان نتیجه گیری کرد که تحت تیپ مورد مطالعه نوپدید بوده و تا به حال در تعدادی از کشورهای منطقه مشاهده گردیده است. علی رغم اینکه ناحیه ژنی 3B حفظ شده می باشد، در مقایسه توالی آمینواسیدی، مشخص شد که در ناحیه 3B2 و 3B3 تحت تیپ نوپدید، آمینواسیدهای متفاوتی جایگزین شده اند. ولی در ناحیه 3B1 هیچگونه جایگزینی آمینواسیدی مشاهده نگردید.

کلمات کلیدی: ژن 3B، تحت تیپ A، آنالیز توالی، PCR.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- ضرورت انجام تحقیق ۳

فصل دوم: مروری بر تحقیقات انجام شده

۲-۱- تاریخچه بیماری تب برفکی در جهان و ایران ٦

۲-۲- طبقه بندی ویروس بیماری تب برفکی ۹

۲-۳- خصوصیات پیکرناویروس ها ۱۱

۲-٤- خصوصیات ویروس بیماری تب برفکی ۱٤

۲-۵- بیماری تب برفکی ۱٤

۲-۵-۱- بیماری زایی و علائم کلینیکی درگاو ۱۵

۲-۵-۲- همه گیری شناسی بیماری تب برفکی ۱۷

۲-۵-۲-۱- کشورهای عاری از بیماری تب برفکی ۱۷

۲-۵-۲-۲- انتقال وگسترش ویروس بیماری تب برفکی ۱۸

۲-۵-۳- کنترل ۱۹

۲-۵-٤- واکسیناسیون ۲۰

۲-۵-۵- تشخیص بیماری تب برفکی ۲۱

۲-۵-٦- بیماری تب برفکی در انسان ها ۲۲

۲-۵-۷- تداوم و پاکسازی ویروس ۲٤

۲-۵-۸- اپیتوپ ها وآنتی ژن های ویروسی ۲۵

۲-٦- واکنش زنجیره ایی پلی مراز ۲٦

۲-٦-۱- چگونگی انجام واکنش PCR ۲۷

عنوان | صفحه

۲-۷- تکامل ژنتیکی ویروس ۲۹
۲-۷-۱- میزان جهش ها در ویروس بیماری تب برفکی ۲۹
۲-۸- چرخه تکثیر ویروسی ۳۰
۲-۸-۱- اتصال ۳۱
۲-۸-۱-۱- گیرنده های سلولی ۳۱
۲-۸-۱-۲- گیرنده های جایگزین ۳۲
۲-۸-۱-۳- اتصال پیکرناویروس ها به گیرنده های سلولی ۳۲
۲-۸-۲- ورود به داخل سلول از طریق اندوسیتوز ۳۳
۲-۸-۳- آزاد شدن اسید نوکلئیک یا uncoating ۳٤
۲-۸-٤- همانندسازی ژنوم و بیان ژن ۳٦
۲-۸-٥- مونتاژ ویروسی ۳٦
۲-۸-٦- بلوغ ۳۷
۲-۹- ویروس بیماری تب برفکی از دیدگاه مولکولی ۳۸
۲-۹-۱- ناحیه ٥′ ترجمه نشده ۳۸
۲-۹-۱-۱- کلاهک پروتئینی ۳۸
۲-۹-۱-۲- قطعه s، پلی C، Pseudoknot و ساختارهای Cre ۳۹
۲-۹-۱-۳- پروتئاز رهبر ٤۰
۲-۹-۲- ژن هایی که پروتئین های ساختاری را رمزگذاری می کنند ٤۰
۲-۹-۳- ژن هایی که پروتئین های غیر ساختاری را رمزگذاری می کنند ٤۱
۲-۹-۳-۱- ژن غیرساختاری 3B ٤۲

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱- استخراج RNA به روش اسید فنول گوانیدیوم تیوسیانات – استخراج کلروفرم ٤٥
۳-۲- استخراج RNA به روش کیت ٤٦
۳-۳- واکنش RT-PCR ٤۸

عنوان | صفحه

۳-۳-۱- روش انجام واکنش PCR در سیستم رونویسی معکوس ۵۰
۳-٤- طراحی پرایمر ۵۱
۳-۵- بررسی، تجزیه و تحلیل محصول حاصل از واکنش PCR ۵۲
۳-۵-۱- بافر الکتروفورز ۵۳
۳-۵-۲- تهیه ژل آگارز ۵٤
۳-٦- خالص سازی محصول PCR ۵۷
۳-٦-۱- مراحل خالص سازی با کیت ۵۹
۳-۷- واکنش Ligation ٦۰
۳-۸- ترانسفورمیشن ٦۱
۳-۸-۱- پروسه آماده سازی سلول های باکتریایی ٦۱
۳-۸-۲- روش تهیه ماده رنگیX-Gal ٦۵
۳-۸-۳- روش تهیه IPTG ٦٦
۳-۸-٤- چگونگی تهیه محیط کشت LB یا محیط لوریا برتانی ٦٦
۳-۸-۵- تهیه استوک آنتی بیوتیک آمپی سیلین ٦۷
۳-۸-٦- واکنش ترانسفورمیشن ٦۸
۳-۸-۷- مراحل انجام ترانسفورمیشن ٦۸
۳-۸-۸- تخلیص پلاسمید ۷۱
۳-۸-۸-۱- تخلیص پلاسمید با روش مینی پرب به منظور تأیید واکنش ترانسفورمیشن ۷۱
۳-۸-۸-۲- تخلیص پلاسمید با تعداد کپی بالا به روش Alkalin lysis ۷٤
۳-۹- آنالیز توالی ۷۷

فصل چهارم: نتایج و بحث

٤-۱- تخلیص RNA و RT-PCR ۷۹
٤-۲- کلونینگ ناحیه ژنی3ABC ۸۰
٤-۳- تأیید پلاسمید نو ترکیب با استفاده از تکنیک PCR ۸۱
٤-٤- خصوصیات پروتئین 3B ۸۲

عنوان | صفحه

٤-٥- تعیین موقعیت ژن3B ٨٤
٤-٦- آنالیز داده های توالی ٨٤
٤-٧- نتایج مقایسه ژنتیکی ایزوله ها براساس ناحیه ژنی غیر ساختاری 3B ٨٥
٤-٨- آنالیز توالی آمینواسیدی کپی های ژنی 3B1، 3B2 و 3B3 ..... ٩٣
نتیجه گیری ٩٩

پیشنهادات ١٠٠
فهرست واژه های علمی ١٠١
فهرست منابع ١٠٦

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول ۲-۱) هفت جنس اصلی خانواده پیکرناویروس ها ۹
جدول ۳-۱) مواد لازم برای انجام واکنش RT-PCR ٤۹
جدول ۳-۲) تشکیل cDNA و شرایط انجام واکنش PCR ٥۱
جدول ۳-۳) مواد و وسائل مورد نیاز برای ساخت ژل آگارز ٥۳
جدول ۳-٤) ترکیبات لازم برای ساخت بافر TAE ٥٤
جدول ۳-٥) غلظت ژل آگارز بر اساس طول DNA ٥٥
جدول ۳-٦) محاسبه مقدار محصول PCR لازم برای انجام واکنش Ligation ٦۰
جدول ۳-۷) مواد مورد نیاز برای انجام واکنش Ligation ٦۱
جدول ۳-۸) مواد و وسائل مورد نیاز برای ساخت محیط کشت LB ٦۷
جدول ۳-۹) مواد و وسائل مورد نیاز برای انجام واکنش ترانسفورمیشن ٦۸
جدول ۳-۱۰) مواد و وسائل مورد نیاز در تخلیص پلاسمید به روش مینی پرب ۷۲
جدول ۳-۱۱) ترکیبات حلال های مورد استفاده در تخلیص پلاسمید ۷۳
جدول ۳-۱۲) مواد و وسائل مورد نیاز در تخلیص پلاسمید به روش با تعداد کپی بالا ۷٥
جدول ٤-۱) شباهت ژنتیکی ایزوله های سروتایپ A کشورهای همسایه ۸۷
جدول ٤-۲) شباهت ژنتیکی تحت تیپ نوپدید و شش سروتایپ دیگر ۸۸
جدول ٤-۳) شباهت ژنتیکی ایزوله های سروتایپ A سراسر جهان ۹۰

فهرست اشکال

عنوان صفحه

شکل ۲-۱) طبقه بندی ویروس تب برفکی ۱۰
شکل ۲-۲) ژنوم RNA تک رشته ایی به یک پلی پروتئین ترجمه می شود..... ۱۳
شکل ۲-۳) مراحل تکثیر DNA توسط واکنش PCR..... ۲۸
شکل ۲-٤) ساختار ژنوم ویروس بیماری تب برفکی..... ٤۳
شکل ۳-۱) انجام ترانسفورمیشن به وسیله کیت TransformAid™ شرکت فرمنتاز..... ٦۳
شکل ۳-۲) تمایز کلونی های نوترکیب از کلونی های نرمال..... ٦٥
شکل ۳-۳) ساختار شیمیایی X-Gal ٦٥
شکل ۳-٤) ساختار شیمیایی IPTG..... ٦٦
شکل ٤-۱) محصول واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای ناحیه ژنی 3ABC..... ۸۰
شکل٤-۲) تأیید انتقال ژن به پلاسمید بعد از مرحله ترانسفورمیشن ۸۱
شکل ٤-۳) تأیید پلاسمید نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR..... ۸۲
شکل ٤-٤) توالی نوکلئوتیدی ژن 3B ۸٤
شکل ٤-٥) ارتباط فیلوژنی ایزوله های سروتایپ A کشورهای همسایه ۸۷
شکل ٤-٦) ارتباط فیلوژنی تحت تیپ نوپدید و شش سروتایپ دیگر ۸۸
شکل ٤-۷) ارتباط فیلوژنی ایزوله های سروتایپ A سراسر جهان..... ۸۹
شکل ٤-۸) مقایسه توالی آمینواسیدی نسخه ژنی 3B1 تحت تیپ نوپدید با سایر ایزوله ها ۹٦
شکل ٤-۹) مقایسه توالی آمینواسیدی نسخه ژنی3B2 تحت تیپ نوپدید با سایر ایزوله ها ۹۷
شکل ٤-۱۰) مقایسه توالی آمینواسیدی نسخه ژنی3B3 تحت تیپ نوپدید با سایر ایزوله ها..... ۹۸

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

از نظر اقتصادی، بیماری تب برفکی یکی از مهمترین بیماری های ویروسی برای دام های اهلی به شمار می رود. بر طبق مطالعات انجام شده مشخص شده است که ایران جزء کشورهایی می باشد که بیشترین میزان شیوع این بیماری را تا به حال گزارش کرده است. به جهت شیوع بالای بیماری تب برفکی در ایران که به واسطه تیپ های O، Asia1 و A ایجاد می شود، شمار وسیعی از واریانت های جدید این ویروس در طی هفت سال گذشته شناسایی شده اند. عامل بیماری تب برفکی ویروس بوده که قادر است با سرعت بسیار بالایی تکثیر پیدا کند و تمام دام های مراکز پرورش منطقه و اطراف را به این بیماری آلوده کند. این بیماری هر ساله سبب ایجاد خسارت فراوانی در صنایع دامپروری کشورهای مختلف می شود. دامنه میزبانی این دسته از ویروس ها وسیع بوده و می توانند اکثر نشخوارکنندگان و تعدادی از غیرنشخوارکنندگان را نیز آلوده کنند. امروزه تشخیص این بیماری با استفاده از تکنیک های مولکولی از قبیل PCR، Real Time – PCR، RT-PCR و الایزا به طور رایج در اکثر کشورهای جهان انجام می شود و از این طریق بیشتر کشورها قادر هستند تا با شناسایی بیماری، آن را تحت کنترل درآورده و از گسترش بیماری پیشگیری کنند. از آنجایی که عامل این بیماری ویروس می باشد و ویروس ها نیز دائماً در حال جهش و تکامل می باشند، نمی توان الگوی ژنتیکی ثابتی را برای این ویروس ها پیش بینی نمود. به همین دلیل است که ویروس ها از تنوع قابل ملاحظه و چشمگیری در سراسر جهان برخوردار می باشند. مطالعات ژنتیکی و مولکولی ثابت کرده اند که ویروس های خانواده پیکرناویروس ها جزء دسته ایی از ویروس ها می باشند که از واریانس ژنتیکی بسیار بالایی نسبت به سایر گروه ویروس ها برخوردار هستند. به واسطه انجام مطالعات مولکولی بر روی ژنوم این دسته از ویروس ها، می توان میزان و درصد این تنوع را محاسبه کرد. آگاهی از میزان تنوع در بین ویروس ها می تواند به انتخاب سویه واکسنی مناسب و همچنین دقت در تولید واکسن های ویروسی در هر منطقه خاص کمک کند. در ساختار ژنوم ویروس بیماری تب برفکی، ژن 3B را می توان مشاهده نمود. این ژن در بخش غیرساختاری ژنوم جای دارد و مطالعات نشان داده اند که این ژن در سه کپی متفاوت در ویروس های تب برفکی مشاهده شده است. نقش ژن 3B در رمزگذاری پلی پپتید 3B یا VPg می باشد. این پروتئین جزء پروتئین هایی می

باشد که به ژنوم ویروسی متصل بوده و به شدت به انتهای ´۵ RNA ویروس اتصال یافته است. به منظور انجام مطالعات بیشتر بر روی این ژن، در ابتدا لازم است که این ژن کلون و تکثیر گردد و سپس توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی این قطعه دقیقاً مورد مقایسه و تحلیل قرار گیرد. با استفاده از این توالی می توان تنوع ژنتیکی موجود در ژنوم ویروسی بعضی از کشورها را با هم مورد مقایسه قرار داد تا فاصله ژنتیکی بین آنها برآورد شود. تعیین میزان فاصله ژنتیکی به ما کمک خواهد کرد که در کنترل بیماری و همچنین در انتخاب و تولید واکسن مناسب به منظور مقابله با این بیماری شایسته تر عمل کنیم.

۱-۲- ضرورت انجام تحقیق

بر اساس مطالعات سرولوژیکی مشخص شده است که، تحت تیپ نوپدید سروتایپ A در کشور در حال گردش بوده و در مناطق مختلف مورد شناسایی قرار گرفته است. از آنجایی توالی ژنومی تحت تیپ مورد مطالعه هنوز در کشور ایران مورد شناسایی و بررسی قرار نگرفته است، مطالعه بر روی ساختار ژنومی این ویروس ضروری می باشد. مهمترین مسئله در انتخاب واکسن مناسب بر علیه این بیماری، توانایی تشخیص جهش ها و تنوع ژنتیکی موجود بین ایزوله های مختلف می باشد. ثابت شده است که واکسن های تولیدی به جهت مقابله با این بیماری در یک کشور، ممکن است برای مقابله با بیماری در کشور دیگر نتیجه مثبت و مشابه را ایجاد نکنند. ناحیه ژنی 3B جزء نواحی حفظ شده بوده و توالی آن کمتر دچار جهش[1] و تغییر می گردد. به همین منظور این ژن به عنوان ژن کاندید برای انجام مطالعه انتخاب شد. کاندید کردن این قطعه از ژنوم به منظور مطالعه و بررسی توالی ژنومی و پروتئینی ویروس های تحت تیپ نوپدید تب برفکی جدا شده از کشور، می تواند نقش مهمی در انتخاب سویه واکسینال مناسب داشته باشد. از آنجایی که گاو در بین میزبان های مختلف از حساسیت بالایی برخوردار است و همچنین بیشترین درصد دام های اهلی را در صنایع تولیدی و پرورشی کشور شامل می شود، مطالعه این ناحیه از ژنوم ویروس های جدا شده از گاوهای بومی لازم و ضروری به نظر می رسد.

[1] Mutation

امید است که مطالعه حاضر بر روی این توالی ژنومی بتواند در تحقیقات بعدی به منظور بیان آنتی ژن های کارآمد و تولید واکسن های مناسب با هدف مقابله با بیماری مفید واقع گردد. از آنجایی که تحقیقات مولکولی با سرعت بالایی در سراسر جهان رو به پیشرفت می باشند، می توان امیدوار بود که روزی فرا رسد که بتوان با تکیه بر علم ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، بیشتر بیماری های انسانی و دامی را با دقت بالایی مورد مطالعه و درمان قرار داد.

فصل دوم

مروری بر تحقیقات انجام شده

۲-۱- تاریخچه بیماری تب برفکی در جهان و ایران

شناسایی و تشخیص بیماری تب برفکی را می توان به سال ها پیش نسبت داد. این بیماری برای اولین بار از کشور ایتالیا توسط یک فرد ایتالیایی به نام هایرونیمی فراکاستوری[1] در سال ۱۵٤٦، بر اساس مشاهده بیماری که در سال ۱۵۱٤ در ایتالیای شمالی به طور غیر عادی اتفاق افتاده بود و فقط در گاو قابل مشاهده بود، توصیف شد. بعد از گذشت سال ها از مشاهده این بیماری در کشور ایتالیا، در سال ۱٦۸٦ بیماری تب برفکی به طور رسمی و مستند در کشور آلمان گزارش شد (Knowles, 1990 ;2003 Brown,). در سال ۱۷٦٤، عفونی بودن این بیماری توسط شخصی به نام میشل ساگار[2] مورد تأیید واقع شد. در سال ۱۷۸۰ در آفریقای جنوبی، لوالیانت[3] یک بیماری را در گاو توصیف کرد که علائم کلینیکی آن به صورتی بود که پاهای گاوها آسیب دیده و متورم شده بود و بعداً در آن نواحی چرک تولید شده و بعضی اوقات سم های تحلیل رفته نیز مشاهده می شد (Lombard et al., 2007; Knipe *et al.*, 2001). با این وجود در زمان های گذشته، دلایل شیوع بیماری را مربوط به عوامل و شرایط جوی، همچنین شرایط نامساعد زندگی حیوان و مسمومیت های غذایی می دانستند. در سال ۱۸۰۰ توگژیا[4] نام تب برفکی را برای این حالات و علائم مشاهده شده در نظر گرفت (ترابی گودرزی، ۱۳۷٤). در حقیقت شروع مطالعات در رابطه با بیماری تب برفکی توسط لوفلر و فروچ[5] در سال ۱۸۹۸، کمی پیش از یک قرن پیش صورت گرفت. ویروس بیماری تب برفکی اولین ویروس حیوانی بود که توسط لوفلر و فروچ در سال ۱۸۹۸، کشف و مورد شناسایی واقع گردید (Lombard *et al.*, 2007; Knipe *et al.*, 2001). شیوع بیماری تب برفکی در زمان های گذشته آنقدر مهم و پر اهمیت بوده است که منجر به پیشنهاد جایزه ۳۰۰۰ رایش مارکی (واحد پول آلمان) وزارت کشاورزی پروسی (بخشی از آلمان) در سال ۱۸۹۳ برای شخصی که قادر باشد تا علت بیماری را تشخیص دهد یا عامل مسری که سبب بیماری تب برفکی

---

[1] Hieronymi Fracastorii
[2] M. sagar
[3] Le Valliant
[4] Toggia
[5] Loeffler and Frosch