دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد

رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

شناسایی ویروس عامل بیماری نکروز عفونی بافتهای خونساز (IHNV) در ماهی قزل‌آلا به روش nested-RT-PCR و بررسی فیلوژنتیک بر مبنای منطقه mid-G

اساتید راهنما:

دکتر مقصود پژوهنده

دکتر سعید زیبایی

استاد مشاور:

دکتر اکبر ولی‌نژاد

پژوهشگر:

رضا حدادیان

مهر ۱۳۹۱

تبریز / ایران

تقدیم به:

پدرم به استواری کوه

مادرم به زلالی چشمه

همسرم به صمیمیت باران

و همه کسانی که لحظه‌ای بعد انسانی و وجدانی خود را فراموش نمی‌کنند و بر آستان گران سنگ انسانیت سر فرود می‌آورند و انسان را با همه تفاوت‌ها بیش ارج می‌نهند.

تقدیر و تشکر:

حب الوطن من الایمان

ای وطن ای مادر تاریخ ساز

ای مرا بر خاک تو روی نیاز

ای کویر تو بهشت جان من

عشق جاویدان من، ایران من

ای ز تو هستی گرفته، ریشه ام

نیست جز اندیشه ات، اندیشه ام

پس از سپاس و ثنای بی حد بر آستان صفات بی همتای احدیت که در کمال رأفت و در نهایت عطوفت رخصت اتمام این پایان نامه را به نگارنده عطا فرموده است؛ در کمال مودت و مسرت، این پایان نامه را که حاصل ماهها تلاش و کوشش مستمر این جانب بوده است؛ تقدیم می نمایم به ایرانیانی پاک نهاد و نیکوسرشت که به پشتوانه ی دانایی و توانایی توشه گرفته از عرق ملی ، میهنی و مذهبی در سودای تأمین آبادانی و ارتقای ایران کهنسال مجدانه تلاش می ورزند.

کیستم من ذره‌ای اندر زمین بر آسمان — پر زنان همبال پرواز زمان

من ز دل شادی بگیرم نی ز نی — از درون مستی بگیرم نی ز می

دل سپارم من به گل یا هر نگاه آتشین — عاشقم بر خاک گوهر پرور ایران زمین

در ادامه به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق » بسی شایسته است از اساتید فرهیخته و فرزانه آقای دکتر **مقصود پژوهنده** و دکتر **سعید زیبایی** و همچنین دکتر **اکبر ولی‌نژاد** که با کرامتی چون خورشید، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی‌ها و مشاوره‌های کارساز و سازنده بارور ساختند، تقدیر و تشکر نمایم.

رضا حدادیان

چکیده:

ویروس نکروز عفونی بافت‌های خونساز (IHNV) یکی از مهمترین ویروس‌های بیماری‌زا در ماهی قزل‌آلا می‌باشد. IHNV باعث ایجاد اپیدمی بیماری نکروز عفونی بافت‌های خونساز در ماهیان جوان شده و ماهیان بالغ، حامل این ویروس می‌شوند. در این مطالعه، ٤٠ نمونه جمع‌آوری شده از مزارع پرورش قزل‌آلا در استان خراسان رضوی به روش nested-RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. بافت‌های کلیه، کبد و طحال ماهیان و همچنین تخم‌های چشم‌زده در شرایط استریل، جهت بررسی به موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، واحد شمال شرق کشور- مشهد منتقل و هموژن گردید. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، آزمایش RT-PCR برای ژن گلیکوپروتئین، وجود ویروس در یک نمونه را نشان داد. به منظور افزایش اختصاصیت واکنش، یک واکنش ثانویه nested-PCR روی محصول اولیه برای منطقه mid-G صورت پذیرفت. منطقه mid-G یک بخش به طول ۳۰۳ نوکلئوتید در ژن G ویروس IHN است که شامل منطقه تعیین‌کننده آنتی‌ژنیک ویروس می‌باشد. کشف شده که این منطقه برای آنالیزهای فیلوژنتیک این ویروس بسیار باارزش است، به همین دلیل در این مطالعه از همین منطقه برای بررسی فیلوژنتیک ویروس یافت شده و مقایسه آن با ویروس‌های دیگر یافت شده در جهان و ثبت‌شده در پایگاه بانک ژن NCBI و نسب‌شناسی آن استفاده گردید. با بررسی درخت فیلوژنتیک، که به وسیله نرم‌افزار MEGA5 رسم شد، و با مقایسه توالی مورد نظر با توالی‌های مربوط به آمریکا، اروپا، ژاپن و کره، قرابت نزدیک ویروس استحصالی از خراسان رضوی با آمریکا و اروپا را می‌توان توصیه کرد. به احتمال زیاد علت نزدیکی ویروس منطقه مورد مطالعه، واردات تخم چشم-زده از آن مناطق می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بیماری نکروز عفونی بافت‌های خونساز، قزل‌آلای رنگین‌کمان، IHNV، nested-RT-PCR، فیلوژنتیک، منطقه mid-G

فهرست

چکیده I

پیشگفتار II

۱فصل اول ۱

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۱-۱ طبقه‌بندی ویروسها ۳

راسته ویروسها ۳

۱-۱-۲ تشخیص و شناسایی ویروسها ٤

۱-۱-۳ پوشش لیپیدی ویروس ٤

۱-۱-٤ گلیکوپروتئینهای ویروسی ٥

۱-۲ مشخصات رابدوویروسها ٥

۱-۲-۱ ساختمان ٦

۱-۲-۲ واکنش نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی ۷

۱-۲-۳ تکثیر ۷

۱-۲-٤ شکل ۸

۱-۲-٥ اندازه ۹

۱-۲-٦ ترکیب شیمیایی ۹

۱-۲-۷ خصوصیات آنتی ژنی ۱۰

۱-۲-۸ درجه حرارت مطلوب رشد ۱۰

۱-۲-۹ عفونت و بیماری زایی ۱۱

۱-۲-۱۰ انتشار جغرافیایی ۱۱
۱-۲-۱۱ کنترل..... ۱۱
۱-۳ نکروز عفونی بافتهای خونساز ((Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN)). ۱۱
۱-۳-۱ عامل مسبب..... ۱۲
۱-۳-۲ مشخصات ویروس..... ۱۲
۱-۳-۳ پروتئینهای ویروس..... ١٤
۱-۳-۳-۱ ژن پروتئین نوکلئوکاپسید..... ۱۵
۱-۳-۳-۲ ژن فسفوپروتئین ۱۵
۱-۳-۳-۳ ژن ماتریکس..... ۱۵
۱-۳-۳-٤ ژن گلیکوپروتئین ١٦
۱-۳-۳-۵ ژن نانویریون..... ۱۷
۱-۳-۳-٦ ژن پلیمراز..... ۱۷
۱-۳-۳-۷ پایان ژنها و توالی‌های ترجمه نشده..... ۱۸
۱-۳-٤ انتقال..... ۱۹
۱-۳-۵ کنترل..... ۲۱
۱-۳-٦ روشهای شناسایی ویروس IHN..... ۲۲
۱-۳-٦-۱ روشهای بالینی..... ۲۳
۱-۳-٦-۱-۱ نشانه های خارجی..... ۲۳
۱-۳-٦-۱-۲ نشانه های داخلی..... ۲۳
۱-۳-٦-۲ تغییرات بیوشیمیایی ۲۵
۱-۳-٦-۳ آسیب شناسی..... ۲٦
۱-۳-٦-٤ لکه‌ها..... ۲٦
۱-۳-٦-۵ مطالعه سلولهای آلوده با میکروسکوپ الکترونی ۲٦

۱-۳-۷ روشهای شناسایی و تشخیص ویروس IHN ۲۶
۱-۳-۷-۱ کشت سلولی ۲۷
۱-۳-۷-۲ روشهای شناسایی آنتی‌بادی بر پایهٔ آنتی‌ژن ۲۷
۱-۳-۷-۳ تکنیکهای مولکولی ۲۸
۱-۳-۷-۳-۱ واکنش رنجیرهای پلیمراز ۲۸
۱-۳-۷-۳-۲ پروبهای شناسایی ۲۸
۱-۳-۷-۳-۳ توالی یابی ۲۸
۱-۳-۸ رتبه‌بندی آزمونها برای رسیدن به هدف ۲۹
۱-۳-۹ داروها و مواد شیمیایی ضدویروسی ۳۰
۱-۳-۱۰ مصونیت غیراختصاصی ۳۱
۱-۳-۱۱ واکسنهای IHNV ۳۲
۱-٤ فیلوژنتیک ۳۳
۱-٤-۱ آماده سازی داده‌های تکامل ژنتیکی ۳٤
۱-٤-۲ انتخاب توالیهای درست برای ایجاد درخت صحیح ۳۵
۱-٤-۳ استفاده از توالی پروتئین یا DNA ۳۵
۱-٤-٤ انتخاب توالیها برای ایجاد یک درخت ژنی یا یک درخت گونه‌ای ۳٦
۱-٤-٤-۱ اورتولوگ‌ها ۳٦
۱-٤-٤-۲ پارالوگ‌ها ۳۷
۱-٤-٤-۳ گزنولوگ‌ها ۳۷
۱-٤-۵ نکات مهم جهت آمادهسازی یک مجموعه از توالیها به منظور ایجاد درخت تکاملی ژنتیکی ۳۸
۱-٤-۵-۱ اجتناب از توالیها ناقص ۳۸

۱-٤-٥-۲ اجتناب از گزنولوگ‌ها..... ۳۸
۱-٤-٥-۳ اجتناب از توالیهای نوترکیب..... ۳۸
۱-٤-٥-٤ اجتناب از خانواده‌های پیچیدهٔ بزرگ..... ۳۹
۱-٤-٥-٥ یک مجموعهٔ کوچک ایجاد شود..... ۳۹
۱-٤-٥-٦ یک خارج گروهی به مجموعهٔ داده‌ها اضافه کنیم..... ۳۹
۱-٤-٦ ایجاد درخت..... ٤۰
۱-٤-۷ آشنایی با اصطلاحات درخت فیلوژنتیک..... ٤۰
۱-٥ آنالیز ژنتیکی ویروس IHN..... ٤۲
۲فصل دوم..... ٤٦
۲-۱ نمونه برداری..... ٤۷
۲-۱-۱ نمونه برداری از ماهی‌های مشکوک..... ٤۷
۲-۱-۲ نمونه برداری از تخم چشمزده حاصل از مولدین..... ٤۸
۲-۲ هموژن کردن نمونه‌ها..... ٤۸
۲-۳ استخراج RNA..... ٤۹
۲-٤ پرایمر..... ٤۹
۲-٤-۱ آماده سازی پرایمرها..... ٥۰
۲-٥ سنتز cDNA..... ٥۱
۲-٦ سنتز توالی ژن گلیکوپروتئین (G)..... ٥۱
۲-۷ مرحله Nested-RT-PCR و سنتز قطعه mid-G..... ٥۲
۲-۸ الکتروفورز..... ٥۳
۲-۹ استخراج محصول حاصل از Nested-RT-PCR از ژل..... ٥۳

۲-۹-۱ مراحل طی شده جهت تخلیص محصول PCR از ژل..... ۵۳
۲-۱۰ تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی mid-G..... ۵٤
۳فصل سوم..... ۵۹
۳-۱-۱ نتایج استخراج RNA..... ٦۰
۳-۱-۲ نتایج حاصل از PCR..... ٦۱
۳-۱-۳ نتیجه توالی استحصالی..... ٦۳
۳-۲ بحث..... ٦۷

پیشگفتار:

با توجه به رشد سریع صنعت پرورش ماهی و نیاز روز افزون جامعه به این محصول و به طبع آن، افزایش بیماری‌های ماهیان، این نیاز وجود دارد که توان شناسایی سریع و عکس‌العمل به موقع برای مقابله با این بیماری‌ها به گونه‌ای که در اغلب آزمایشگاه‌ها قابل اجرا باشد، افزایش یابد. یکی از این عوامل، ویروس Infectious hematopoietic necrosis virus که عامل بیماری نکروز عفونی بافت‌های خونساز، و از گروه رابدو ویروس‌ها می‌باشد. این بیماری یکی از مهمترین بیماری‌های صنعت پرورش ماهیان سرد آبی بوده که تمامی گونه‌های آزاد ماهیان از جمله ماهی قزل‌آلای رنگین کمان خصوصاً بچه ماهیان به این بیماری بسیار حساس می‌باشند. خطر این بیماری به گونه‌ای است که می‌تواند باعث تلفات شدید حتی در برخی مواقع تا صددرصد بچه ماهیان پرورشی گردد. بیماری به دو صورت افقی و عمودی منتشر شده و با توجه به اینکه ماهیان بزرگ و مولدین به صورت حامل باقی می‌مانند لذا اعمال مقررات پیش‌گیری و قرنطینه از طریق بررسی اپیدمیولوژیکی و بکارگیری روش‌های تشخیص حساس و حذف کانون‌های آلوده جهت مبارزه با بیماری از مهمترین عوامل کنترل بیماری محسوب می‌گردد. ویروس عامل IHN در مزارع پرورش ماهی برخی مناطق کشور شناسایی شده است. با توجه به تلفات سنگین بیماری و باقیماندن ویروس در مزرعه و ابتلای ماهیان مولد و همچنین عدم بررسی این بیماری در استان خراسان و وجود علایم بیماری‌های مشکوک در برخی مزارع و از طرفی شباهت علایم حاصل از این ویروس با چند ویروس دیگر، چنین به نظر می رسد که بررسی مولکولی برای شناسایی این ویروس و تفکیک آن از ویروس‌های دیگر، در استان از اهمیت بسیار زیادی برخوردار می‌باشد. همچنین با استفاده از تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک ناحیه Mid-G که در منطقه کدکننده پروتئین G ویروس IHN قرار گرفته و مقایسه توالی‌های شناسائی شده در استان با سایر ویروس‌هایی که شناسائی شده‌اند با استفاده از رسم دندوگرام فیلوژنتیک ویروس یاد شده به قرابت آن می‌توان پی برد.

لذا این مطالعه با هدف تشخیص و بررسی مولکولی ویروس عامل بیماری IHN در مزارع پرورش ماهی و مراکز تولید تخم چشم‌زده و مقایسه ویروس‌های شناسایی شده در این آزمایش با دیگر ویروس‌ها انجام می‌گیرد.

مقدمه

۱-۱ مقدمه

با وجود اینکه بیماری‌های ویروسی از نظر اقتصادی برای پرورش‌دهندگان ماهی بسیار حائز اهمیت است، مطالعات و تحقیقات انجام شده در زمینه عفونت‌های ویروسی ماهیان بر خلاف دام‌های اهلی قابل توجه نمی‌باشد. در حال حاضر چند نوع ویروس بدست آمده از ماهی، مورد مطالعه دقیق قرار گرفته و طبقه‌بندی آن‌ها مشخص شده است که از آن جمله می‌توان رابدوویروس‌ها را نام برد.

ویروس‌ها کوچکترین عوامل عفونی هستند (قطرشان از حدود ۲۰ تا ۳۰۰ نانومتر متغیر است) و به عنوان ژنوم، فقط یک نوع اسیدنوکلئیک (DNA یا RNA) دارند. اسیدنوکلئیک توسط یک پوسته پروتئینی احاطه شده است که ممکن است این پوسته، درون غشایی حاوی لیپید قرار گرفته باشد. واحد کامل عفونی را ویرون[1] می‌نامند. ویروس‌ها در محیط خارج سلولی غیرفعال هستند و فقط در سلول‌های زنده تکثیر می‌یابند، یعنی در سطح ژنتیکی انگل هستند. اسیدنوکلئیک ویروسی، حاوی کلیه اطلاعاتی است که برای برنامه‌دهی به سلول میزبان آلوده، جهت سنتز ماکرومولکول‌های ویروسی لازم برای تولید نسل بعدی ویروس، ضروری است. در طی چرخه تکثیر، کپی‌های فراوانی از اسید نوکلئیک و پوسته‌های پروتئین ویروسی ساخته می‌شوند. پروتئین‌های پوششی با یکدیگر مجتمع می-شوند تا کاپسید را تشکیل دهند. کاپسید، اسیدنوکلئیک ویروس را دربرگرفته و از آن در برابر عوامل محیطی خارج سلولی محافظت می‌کند و همچنین اتصال و نفوذ ویروس به سلول حساس جدید را، از طریق تماس با آن‌ها تسهیل می‌کند. آلودگی سلول میزبان با ویروس ممکن است بدون اثر یا با اثر کمی برروی سلول میزبان همراه باشد و یا ممکن است منجر به آسیب سلول یا مرگ آن شود.

ویروس‌های شناخته شده به مقدار زیادی از نظر ساختمان، تشکیلات ژنوم و نحوه بیان آن و راهبردهای تکثیر و انتقال متغیرند. تعداد میزبان‌های یک ویروس ممکن است فوق‌العاده زیاد یا خیلی محدود باشد.

[1] - virion

۱-۱-۱ طبقه‌بندی ویروس‌ها:

خانواده[1]:

در سیستم طبقه‌بندی جهانی، ویروس‌ها براساس مورفولوژی، ساختمان ژنوم، و روش تکثیر به گروه‌های بزرگی به نام خانواده تقسیم می‌شوند. نام خانواده ویروس‌ها دارای پسوند viridae- است.

جنس[2]:

در ویروس‌ها، تقسیم جنس بر مبنای تفاوت‌های فیزیکوشیمیایی یا سرولوژیکی صورت می‌گیرد. معیارهای مورد استفاده برای تعریف جنس‌ها در هر خانواده متفاوت است. نام جنس ویروس‌ها پسوند virus– می‌گیرد.

راسته ویروس‌ها[3]:

از راسته ویروس‌ها برای گروه‌بندی خانواده‌های ویروسی با خصوصیات مشترک، می‌توان استفاده کرد. تنها یک طبقه تا کنون تعریف شده است و آن Mononegavirales، که شامل خانواده‌های فیلوویریده[4]، پارامیکسوویریده[5] و رابدوویریده[6] است.

ویروس‌ها فقط یک نوع اسیدنوکلئیک دارند (DNA یا RNA) که اطلاعات ژنتیکی ضروری جهت تکثیر ویروس را کد می‌نماید. ژنوم ویروس ممکن است تک رشته‌ای یا دو رشته‌ای، حلقوی یا خطی، قطعه قطعه یا بدون قطعه باشد. اندازه RNA ژنوم ویروسی بین ۷ Kb تا ۳۰ Kb متفاوت می‌باشد. RNA ویروسی به چندین شکل وجود دارد. RNA ممکن است یک مولکول خطی منفرد باشد. ژنوم برخی از ویروس‌ها به صورت قطعاتی از RNA بوده که به طور ضعیفی درون ویریون با هم در ارتباطند. RNA مجزا شده ویروسی در ژنوم‌های ویروسی Positive sense مانند

[1] -Family
[2] -Genera
[3] -Virus order
[4] -Filoviridae
[5] -Paramixoviridae
[6] -Rhabdoviridae

پیکورناویروس‌ها، عفونی است، به علت اینکه به عنوان mRNA در درون سلول آلوده شده عمل می‌کنند. RNA مجزا شده از ویروس‌های دارای RNA از نوع negative sense مانند رابدوویروس-ها عفونی نیست. در این خانواده‌های ویروسی، ویریون یک RNA پلی‌مراز را با خود حمل می‌کند که درون سلول چندین مولکول RNA مکمل از RNA ژنوم ویروسی سنتز می‌کند و هر یک از این مولکول‌های RNA جدید به عنوان یک mRNA عمل می‌کنند.

توالی‌ها و ترتیب نوکلئوتیدها در هر یک از اسیدهای نوکلئیک ویروسی، اختصاصی است. تعداد ژن‌های موجود در یک ویروس را براساس قسمت‌های Open reading موجود در توالی ژنوم میتوان تخمین زد.

۱-۱-۲ تشخیص و شناسایی ویروس‌ها:

اسیدهای نوکلئیک ویروسی را می‌توان براساس محتوای G+C تشخیص داد. در این روش DNA ژنوم ویروس را می‌توان آنالیز نموده و با به کار بردن اندونوکلئازهایی با عمل محدود[1] (آنزیم‌هایی که DNA را در توالی‌های خاص نوکلئوتیدی شکاف می‌دهند) با هم مقایسه نمود. پس از برش هر ژنوم به وسیله آنزیم، هر ژنوم مجموعه خاصی از قطعات DNA را تولید خواهد کرد. با استفاده از کپی‌های DNA که به طور مولکولی از RNA کلون شده‌اند می‌توان نقشه‌های انحصاری را برای RNA ژنوم ویروسی ترسیم نمود. با مطالعه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکنیک هیبریداسیون مولکولی (DNA به DNA، DNA به RNA، RNA به RNA)، بررسی نسخه‌برداری از ژنوم ویروسی درون سلول آلوده و همچنین مقایسه ارتباط ویروس‌های مختلف مقدور شده است.

۱-۱-۳ پوشش لیپیدی ویروس:

برخی از ویروس‌های مختلف دارای پوشش لیپیدی به عنوان قسمتی از ساختمان خود هستند. هنگامی که نوکلئوکاپسید ویروس در طی تکامل ویروسی از خلال غشاء پلاسمایی جوانه می‌زند، پوشش لیپیدی به ویروس اضافه می‌شود. ویروس‌های دارای پوشش لیپیدی به اتر و حلال‌های دیگر

[1] -Restriction endonucleases

شیمیایی حساس هستند، و به علت گسستن یا از دست دادن لیپید، عفونت‌زایی ویروس از بین می-رود. ویروس‌های فاقد لیپید معمولاً نسبت به اتر مقاوم هستند.

۱-۱-٤ گلیکوپروتئین‌های ویروسی:

پوشش ویروس‌ها حاوی گلیکوپروتئین‌ها است. برخلاف لیپید موجود در پوشش ویروس که منشأ آن سلول میزبان است، گلیکوپروتئین‌های پوششی توسط خود ویروس کد می‌شوند. با این وجود، قندهایی که به گلیکوپروتئین‌های ویروسی اضافه می‌شوند، غالباً سلول میزبانی که ویروس در آن‌ها رشد کرده را نشان می‌دهد.

گلیکوپروتئین‌های موجود در پوشش ویروس معمولاً بر اثر واکنش متقابل به گیرنده‌های سلولی می‌چسبند. این مواد همچنین غالباً در مرحله ادغام[1] غشاء در عفونت ویروسی دخالت دارند. گلیکوپروتئین‌ها همچنین آنتی‌ژن‌های ویروسی مهم هستند. همچنین به علت محل این مواد در سطح خارجی ویریون، این مواد در واکنش متقابل با آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده دخالت دارند.(جاوتز، ۲۰۱۰)

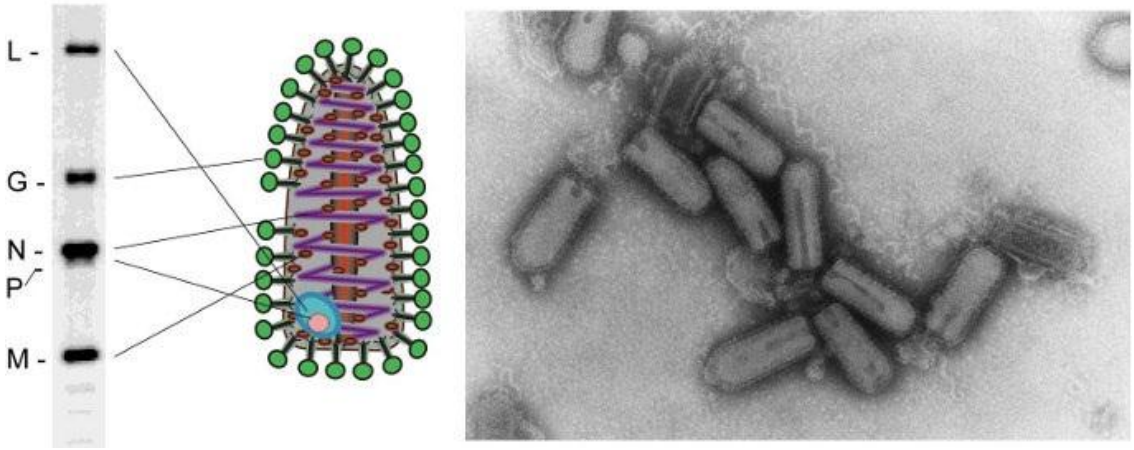
۱-۲ مشخصات رابدوویروس‌ها[2]:

ویروس IHN یکی از اعضاء خانواده Rhabdoviridae است که به بیماری‌های حاد سیستمیک و اغلب بدخیم هر سالمون و انواع قزل‌آلای وحشی و پرورشی منجر می شود (ولف، ۱۹۸۸؛ وینتون، ۱۹۹۱). برگمن و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که IHNV از جنس Novirhabdovirus بوده، که به خانواده Rhabdoviridae تعلق دارد ودر دسته Mononegavirales می‌باشد.

جزئیات خصوصیات فیزیکوشیمیایی و سرولوژیکی رابدوویروس‌ها به وسیله Hill و همکاران در سال ۱۹۷۵ بیان شد.

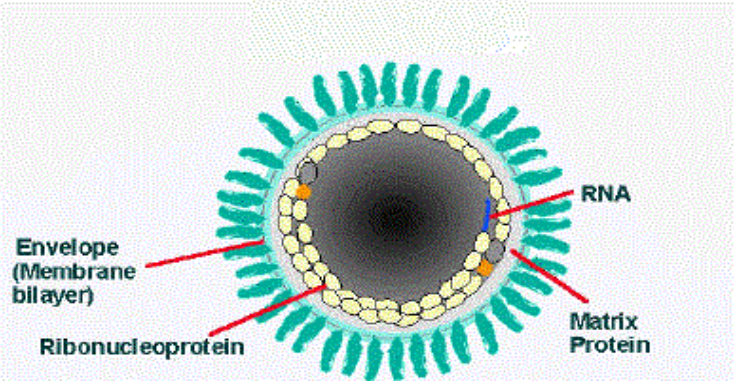
[1] - Fusion
[2]- Rhabdoviruses

۱-۲-۱ ساختمان:



شکل ۱-۱: شمایی از رابدوویروس

رابدوویروس‌ها، ذراتی میله‌ای یا گلوله‌ای شکل با اندازه ۷۵ × ۱۸۰ نانومتر هستند. ذرات رابدوویروس‌ها به وسیله یک پوشش غشایی با برجستگی‌هایی به طول ۱۰ نانومتر پوشیده شده‌اند (شکل ۱-۱). پپلومرها (برجستگی‌ها) از تری‌مرهای گلیکوپروتئینی ویروسی (G) تشکیل شده‌اند. درون پوشش ویروسی، ریبونوکلئوکاپسید وجود دارد. ژنوم این ویروس‌ها به صورت RNA تک رشته‌ای و Negative sense (با وزن مولکولی ٤/٦ میلیون دالتون، حدوداً ۱۲ کیلوباز) است. ویریون‌ها حاوی یک RNA پلی‌مراز وابسته به RNA هستند. تراکم شناوری ذرات در کلرید سزیم حدود ۱/۱۹ گرم بر سانتیمتر مکعب و وزن مولکولی آن‌ها ۳۰۰ تا ۱۰۰۰ میلیون دالتون می‌باشد.



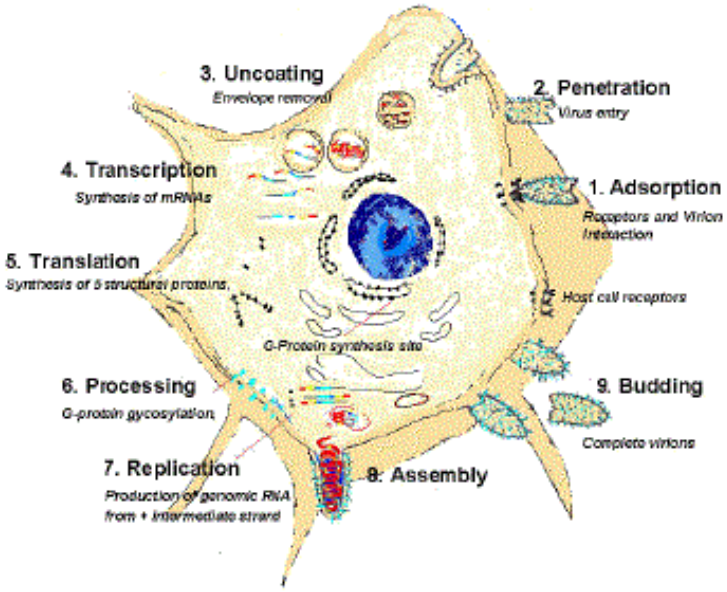
شکل ۱-۲: شمایی از برش قطری رابدوویروس‌ها

۱-۲-۲ واکنش نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی:

این ویروس‌ها هفته‌ها در دمای ٤ درجه سانتیگراد فعال می‌مانند، اما بوسیله CO_2 غیر فعال می‌شوند. بنابراین آن‌ها را باید خشک و در ظروف شیشه‌ای دربسته ذخیره نمود. این ویروس‌ها به سرعت در اثر پرتو فرابنفش یا نور خورشید، حرارت، تریپسین، دترژانت، حلال‌های چربی و بوسیله PH خیلی بالا یا خیلی پایین غیرفعال می‌شوند.

۱-۲-۳ تکثیر:

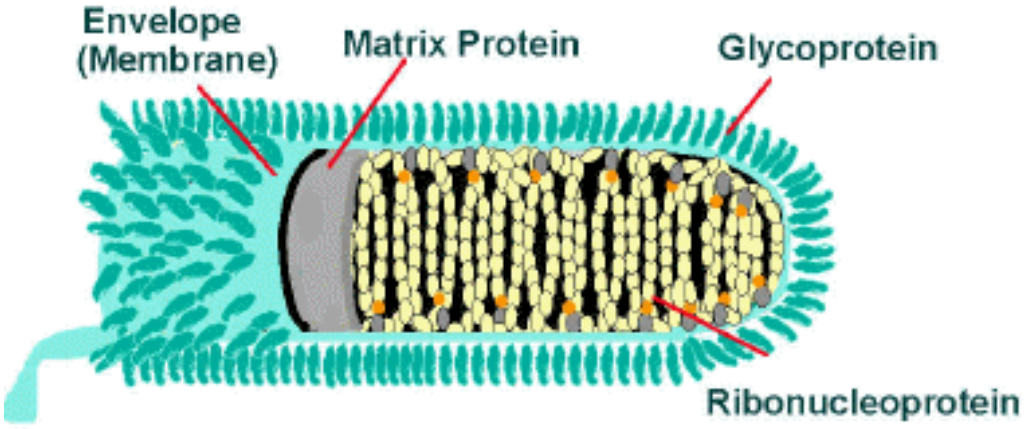
چرخه تکثیر رابدوویروس در شکل۱-۳ نشان داده‌شده‌است. این ویروس‌ها بوسیله برجستگی‌های گلیکوپروتئینی به سلول‌ها متصل می‌شوند. RNA تک رشته‌ای ویروس بوسیله RNA پلی‌مراز موجود در ویریون به صورت ٥ یا ٦ قطعه mRNA رونوشت می‌گردد. الگوی نسخه‌برداری، RNA ژنومی، به صورت ریبونوکلئوپروتئین (احاطه شده بوسیله پروتئین N و حاوی ترانس کریپتاز ویروسی) می‌باشد. mRNAهای دارای یک سیسترون، ٥ یا ٦ پروتئین ویریون را کد می‌کند. ریبونوکلئوپروتئین‌ها به عنوان الگویی برای تولید RNA مکمل زنجیره مثبت عمل می‌کنند که خود مسئول تولید نسل جدید RNA زنجیره منفی می‌باشند. پروتئین‌های ویروسی مشابه پلیمراز در همانندسازی RNA ویروسی و همچنین در نسخه برداری شرکت دارند. برای انجام همانند سازی، ادامه فرآیند نسخه‌برداری بخصوص در مورد پروتئین‌های ویروسی N و P ضروری است. RNA ژنومی سنتز شده با ترانس‌کریپتاز ویروسی و نوکلئوپروتئین در سیتوپلاسم مجتمع شده، هسته ریبونوکلئوپروتئین را تولید می‌کند. ذرات ویروسی با جوانه زدن از خلال غشاء پلاسمایی، دارای پوشش می‌شوند. پروتئین ماتریکس ویروسی یک لایه در سطح داخلی پوشش ویروسی تشکیل می‌دهد، در حالی که گلیکوپروتئین ویروسی به صورت برجستگی‌هایی بر سطح خارجی ویریون قرار می‌گیرد.(جاوتز، ۲۰۱۰)



شکل ۱-۳: چرخه القاء و تکثیر ویروس

۱-۲-٤ شکل:

تمام رابدوویروس اشکال یکسان داشته فقط رابدوویروس کارپیو اندکی کوتاه تر از بقیه است. و همچنین دارای تقارن مارپیچ گلوله ای شکل (مرکب) هستند.



شکل ۱-٤: اتصال زیرواحدهای پروتئینی به اسیدهای نوکلئیک

در تقارن مارپیچی[1]، زیرواحدهای پروتئینی به صورت متناوب به اسیدنوکلئیک ویروس متصل

[1] - Helical Symmetry

شده‌اند، به طوری که به صورت یک مارپیچ خم شده‌اند. سپس مجموعه پروتئین و اسیدنوکلئیک ویروسی (نوکلئوکاپسید) به صورت کلافه‌ای درون پوششی حاوی لیپید قرار می‌گیرد. بنابراین برخلاف ساختمان‌های بیست وجهی، در ویروس‌های دارای تقارن مارپیچی رابطه‌ای متقابل و منظم بین پروتئین و اسیدنوکئیک وجود دارد و تشکیل ذرات مارپیچی توخالی ممکن نیست. تمام ویروس-های حیوانی شناخته شده با تقارن مارپیچی دارای ژنوم RNA بوده و بجز رابدوویروس‌ها همگی نوکلئوکاپسید قابل انعطاف دارند که به صورت کلافه‌ای درون پوشش ویروس قرار گرفته است.(جاوتز، ۲۰۱۰)

۱-۲-۵ اندازه:

اندازه کوچک و توانایی عبور از فیلترهایی که مانع عبور باکتری می‌شوند، از خصوصیات کلاسیک ویروس‌ها به شمار می‌روند، اما به علت اینکه بعضی از باکتری‌ها از بزرگترین ویروس‌ها کوچکتر می‌باشند، بنابراین قابلیت عبور از فیلترهای مزبور به عنوان ویژگی اختصاصی ویروس‌ها در نظر گرفته نمی‌شود.

برای تعیین اندازه ویروس‌ها و اجزاء آن‌ها از روش‌های زیر استفاده می‌شود:

- مشاهده مستقیم توسط میکروسکوپ الکترونی
- عبور از فیلتر غشایی با منافذی در اندازه‌های معین
- رسوب در اولتراسانتریفیوژ
- اندازه‌گیری‌های مقایسه‌ای

۱-۲-٦ ترکیب شیمیایی:

همه آن‌ها یک رشته RNA منفرد داشته و ضریب ترسیب (سدیمانتاسیون) مساوی دارند (۳۸ تا ٤۰ ثانیه). از نظر ترکیب پلی‌پپتید ویروس‌های IHN و VHS شبیه ویروس هاری می‌باشند.

۱-۲-۷ خصوصیات آنتی‌ژنی:

پروتئین‌های ساختمانی ویروس دارای کارکردهای مهم متعددی هستند. هدف اصلی آن‌ها تسهیل انتقال اسیدنوکلئیک ویروسی از یک سلول میزبان به یک سلول دیگر است. همچنین این مواد از ژنوم ویروس در برابر غیرفعال شدن توسط نوکلئازها محافظت می‌کنند، در اتصال ذره ویروس به سلول حساس دخالت دارند و تقارن ساختمانی ذره ویروس را تشکیل می‌دهند. پروتئین‌ها، ویژگی-های آنتی‌ژنی ویروس را تعیین می‌کنند. پاسخ ایمنی میزبان بر علیه شاخص‌های آنتی‌ژنیک پروتئینی، یا گلیکوپروتئینی واقع در سطح ذره ویروسی ایجاد می‌شود. برخی از ویروس‌ها دارای آنزیم‌هایی درون ویریون خود هستند. آنزیم‌ها در مقادیر بسیار کم وجود دارند و احتمالاً در ساختمان ذره ویروسی اهمیت چندانی ندارند، اما وجود آن‌ها برای آغاز چرخهٔ تکثیر ویروس در زمانی که ویریون به داخل سلول میزبان وارد می‌شود، ضروری است. نمونه این آنزیم‌ها، RNA پلی‌مراز موجود در ویروس‌های با ژنوم RNA از نوع Negative sense (مانند رابدوویروس‌ها) است که برای کپی کردن اولین mRNAها مورد نیاز است و یا آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس، آنزیمی که در رتروویروس‌ها وجود دارد و عمل تهیه DNA از RNA ویروسی را که مرحله ضروری در تکثیر و نسخه‌برداری است، انجام می‌دهد.(جاوتز، ۲۰۱۰)

واکنش متقابل (cross-reaction) بین ویروس‌های PF، IHN وSVS تا اندازه‌ای صورت می-گیرد. شواهد محدودی نشان می‌دهد که هیچکدام از آنها از نظر تولید پادتن خنثی کننده محرک، خوب نبوده و حداقل یکی از آن‌ها (VHS) تولید انترفرون را به خوبی تحریک می‌کند.

۱-۲-۸ درجه حرارت مطلوب رشد:

درجه حرارت مطلوب رشد برای IHN و VHS، برخلاف PF که ۱٤ درجه سانتی گراد و SVS که ۲۲ درجه سانتی‌گراد است، ۱۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.