

Rearranged Bovine Rotavirus Production through Cultivation of Virus by High Multiplicity of Infection (MOI) in Cell Culture and Amplification of Non-structural Genes using RT-PCR

Elham Ahmadi¹, Hoorieh Soleimanjahi^{2*}, Majid Sadeghizadeh³, Ali Teimoori⁴

- 1- M.Sc. Student, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Associated Professor, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- Ph.D. Candidate, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: soleim_h@modares.ac.ir

Received: 23/Sep/2012, Accepted: 12/Dec/2012

Abstract

Objective: Group A rotaviruses (GARV) are responsible for the vast majority of severe diarrhea worldwide that kills an estimated 600,000-870,000 children annually. Since infantile gastroenteritis is a main health problem, therefore diagnosis and treatment of this disease is crucial. Gene rearrangements have been detected in vitro during serial passages of the virus at a high multiplicity of infection (MOI) in cell culture, as well as in chronically infected immunodeficient individuals. In this study, we developed an RT-PCR method to detect and diagnose the standard and gene rearranged bovine rotavirus.

Methods: Rotavirus RNA was extracted from confluent monolayers of infected MA-104 cells, stained with silver nitrate, and then electrophoresed in a 10% polyacrylamide gel. The full-length gene products that encoded the NSP1, 2, and 3 genes of the standard and rearranged rotavirus were amplified by RT-PCR using specific primers.

Results: We observed rearranged NSP1 and NSP3 genes that had different migration patterns seen with polyacrylamide gel electrophoresis. NSP1, 2, and 3 gene segments from standard and rearranged rotaviruses were amplified by RT-PCR, then the complete nucleotide sequence of each gene was subjected to sequencing. The results showed the generation of gene rearrangement through serial passages of the bovine rotavirus RF strain.

Conclusion: Serial passage of rotavirus in cell culture at a high MOI and chronic infection in immunodeficient target groups might alter rotavirus evolution. The methods utilized for detection and characterization of rotaviruses are continually evolving and being refined. Data collection is necessary to understand the molecular and antigenic features of the rotavirus in order to have a successful implementation of rotavirus studies and the development of a rotavirus vaccine. This study shows the importance of genetic variation and can provide valuable information about the amplification, diversity, biology, and evolution of rotaviruses.

Keywords: Rotavirus, Gastroenteritis, Rearrangement, Sequencing

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 3, Autumn 2012, Pages: 1-9

تولید روتاویروس گاوی باز آرایی شده از طریق تکثیر آن با نسبت بالای عفونت‌زایی ویروس به سلول در کشت سلول و تکثیر ژن‌های غیر ساختمانی با روش RT-PCR

الهام احمدی^۱، حوریه سلیمان‌جاهی^{۲*}، مجید صادقی زاده^۳، علی تیموری^۴

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۲- دانشیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۳- استاد، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۴- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی
 Email: soleim_h@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۹/۲۲

دریافت مقاله: ۹۱/۰۷/۰۲

چکیده

هدف: گروه A روتاویروس، مهم‌ترین عامل ویروسی گاستروانتریت و اسهال شدید در نوزادان و کودکان و مسئول حدود ۶۰۰ تا ۸۷۰ هزار مرگ در سال است، بنابراین تشخیص و درمان این بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بازآرایی ژن‌ها طی پاساژهای متوالی ویروس با نسبت بالای عفونت‌زایی در کشت سلول و همچنین در عفونت‌های مزمن در بیماران با نقص ایمنی تشخیص داده شده است. در این مطالعه روش RT-PCR برای ردیابی، تشخیص و تکثیر ژن‌های روتاویروس استاندارد و بازآرایی شده راه‌اندازی شده است.

مواد و روش‌ها: RNA روتاویروس از رده سلولی MA-104 آلوده استخراج شد و حضور ژنوم توسط الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره، مشخص شد. تکثیر توالی کامل ژن‌های کد کننده NSP1, 2, 3، با واکنش RT-PCR، برای روتاویروس استاندارد و بازآرایی شده، با آغازگرهای اختصاصی انجام گرفت.

نتایج: بازآرایی در ژن‌های NSP1, 3 با تغییر الگوی مهاجرت این قطعات در ژل، توسط الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید نشان داده شد. طول کامل محصولات ژن‌های کد کننده NSP1, 2, 3 برای روتاویروس استاندارد و بازآرایی شده تکثیر شد و برای تعیین توالی ارسال شد. نتایج، شکل‌گیری قطعات ژنومی بازآرایی شده، طی پاساژ متوالی روتاویروس گاوی سویه RF را نشان داد.

نتیجه‌گیری: تکثیر متوالی ویروس با نسبت بالای عفونت‌زایی در کشت سلول و همچنین عفونت‌های مزمن در گروه‌های هدف با نقص ایمنی در تکامل آن نقش دارد و از طرف دیگر روش‌های استفاده شده برای تعیین ویژگی به طور مداوم در حال تحول و تعریف مجدد است. با در نظر گرفتن تحقق موفقیت مطالعات روتاویروس و اهمیت زیاد توسعه واکسن‌های روتاویروسی، مطالعه بیشتر جزئیات بازآرایی و جمع‌آوری داده برای فهم بهتر ویژگی‌های آنتی‌ژنیک و مولکولی ویروس لازم است. مطالعه حاضر اهمیت تنوع ژنتیکی را نشان داده و می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در زمینه تکثیر، تنوع، زیست‌شناسی و تکامل روتاویروس را فراهم نماید.

کلیدواژگان: روتاویروس، گاستروانتریت، بازآرایی، تعیین توالی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحات: ۹-۱

تولید روتاویروس گاوی بازآرایی شده از طریق تکثیر ویروس با نسبت بالای عفونت‌زایی

RNA قطعه قطعه نیز وقوع چنین رخدادی مطرح است، بنابراین امکان مطالعه تشخیص توالی‌های مؤثر در زمینه بازآرایی، فراهم شده و می‌تواند در ردیابی گونه‌های متنوع (Quasispecies) روتاویروس و ویروس‌های دیگر با ژنوم RNA قطعه قطعه و نیز تعیین فاکتورهای مؤثر در گرایش بافتی، حدت (Virulence) و تعاملات ویروس و میزبان، گسترش یابد [۱۰، ۱۱].

مواد و روش‌ها

کشت سلول و تکثیر ویروس

در این مطالعه تجربی سلول MA-104 برای کشت روتاویروس گاوی (Bovine Rotavirus) سوش RF استفاده شد. این سلول از کلیه میمون رزوس ماکاک، منشأ گرفته و از نوع سلول‌های پوششی است. این سلول از بانک سلول انستیتو پاستور ایران دریافت شد و در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco، آمریکا) حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (Penicillin) (۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر) استرپتومایسن (Streptomycin) (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و FBS (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد کشت داده شد. بعد از مدت ۴۸ ساعت سلول‌ها به ۱۰۰ درصد تلاقی (Confluency) رسیدند و برای کشت ویروس آماده شدند [۱۲]. سپس برای فعال شدن ویروس روتای گاوی (RF)، از تریپسین (Pancreatic Trypsine Porcine Type IX) (Sigma، آلمان) با غلظت ۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر استفاده شد و در فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی حاوی محیط بدون سرم کشت داده شد و در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO₂ نگهداری شد [۱۳-۱۷].

استخراج RNA ویروس

سلول‌ها در پاساژهای پشت سرهم با ویروس، علایم تخریب سلولی (Cytopathic) را نشان دادند. برای استخراج

مقدمه

گروه A روتاویروس (Rotavirus) از اعضای خانواده رتوویریده (Reoviridae) و علت اصلی بیماری گاستروانتریت حاد (Acute Gastroenteritis) در انسان و حیوانات اهلی در بیشتر نقاط دنیا است. اعضای جنس روتاویروس بدون پوشش و دارای ژنوم RNA دو رشته‌ای ۱۱ قطعه‌ای، درون سه پوسته پروتئینی هستند. الگوی ژنومی روتاویروس به خوبی نمایش و تعریف شده است؛ با این حال برخی از روتاویروس‌های گروه A الگوی الکتروفورزی جدید و غیرمعمولی را نشان می‌دهند که قطعه استاندارد در آن‌ها توسط قطعه نوترتیب و بازآرایی شده که اغلب اندازه بزرگ‌تری دارند، جایگزین می‌شود و علاوه بر روتاویروس انسانی در گونه‌های متنوع حیوانی نیز رخ می‌دهد. جداسازی روتاویروس از نمونه‌های متوالی مدفوعی از کودکان مبتلا به فرم مزمن (Severe Combined Immunodeficiency) SCID، نوترکیبی روتاویروس به شکل بازآرایی را نشان می‌دهد. بنابراین حضور و ظهور الگوهای الکتروفورتایپ (Electrophoretotype) مجزا، از جنبه تشخیصی اهمیت دارد که با الکتروفورز و رنگ‌آمیزی نیترات نقره قابل مشاهده است [۱-۶].

پاساژهای (Passages) پیاپی در شرایط آزمایشگاه و با نسبت بالای عفونت‌زایی (High Multiplicity of Infection) یکی از عوامل تأثیرگذار در ایجاد این ذرات نوترتیب است که گاهی در تکثیر روتاویروس اتفاق می‌افتد. بازآرایی یک مکانیسم افزاینده یا کاهنده در اندازه قطعات ژنومی یا طول ژنوم است که در اثر تکثیر بخشی از توالی ژنوم ویروس رخ می‌دهد و به نظر می‌رسد در بیشتر ویروس‌های دارای ژنوم RNA دو رشته‌ای و قطعه قطعه، امکان‌پذیر باشد [۷-۹]. بررسی قطعات بازآرایی شده به دلیل نبودن توالی کامل ژنوم با موفقیت همراه نبوده است. به نظر می‌رسد با فراهم شدن امکان تعیین توالی کامل ژنوم یا حداقل برخی از قطعات ژنی روتاویروس، مطالعه در زمینه بازآرایی و تعیین قطعات تغییر یافته، میسر شود. با توجه به این‌که در سایر ویروس‌های با ژنوم

(National Center Biotechnology Information) موجود بود، طراحی و توسط شرکت EUROFINs (انگلستان) ساخته شد (جدول ۱).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (5x) واجد $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرولیتر از هر dNTP، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و ۲ میکرولیتر از DNA الگو (ژن‌های محصول واکنش RT) انجام شد. شرایط واکنش به صورت ابتدا ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۲/۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۵ چرخه و در نهایت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. نکته قابل توجه این است که به دلیل مستعد بودن ژنوم برای تشکیل ساختارهای ثانویه، مرحله تکثیر ژنوم با مقادیر مختلف بتائین (Betaine) ۰/۸، ۱/۴، ۱/۸ و ۲ مولار بهینه‌سازی شد که ۱/۸ مولار به عنوان مقدار بهینه در نظر گرفته شد.

ژنوم دو رشته‌ای RNA ویروس سویه RF بازآرایی شده و استاندارد استخراج شده، براساس نسخه‌برداری معکوس، ابتدا رونویسی معکوس شد. سپس در فرآیند PCR با استفاده از کیت Two-step RT-PCR (Vivantis، مالزی) و آغازگرهای سنتز شده، DNA های دو رشته‌ای تکثیر داده شد و طول کامل cDNA از RNA دو رشته‌ای خالص شده به‌دست آمد. محصولات PCR فوق توسط کیت استخراج DNA (Qiagen، آلمان) از ژل آگارز ۱/۵ درصد تخلیص و برای تعیین توالی ارسال شد.

RNA ویروس، سلول‌های آلوده دو بار منجمد و ذوب شدند و سوپ سلولی جمع‌آوری شد. پس از سانتریفوژ در ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه برای حذف رسوب سلولی، مراحل استخراج RNA مطابق با دستورالعمل RNeasy Mini Kit (Qiagen، آلمان) انجام شد.

تجزیه و تحلیل الکتروفورز

به منظور بررسی الگوی الکتروفورزی، ژنوم ویروس‌های استخراج شده روتاویروس سوش RF استاندارد و بازآرایی شده، توسط ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره بررسی شد.

طراحی آغازگر (Primer) و آزمون RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

از روش‌های کلاسیک مطالعه ژنوم می‌توان به هیبریداسیون (Hybridization) و نورترن بلات (Northern Blot) اشاره کرد. روش PCR به عنوان یکی از حساس‌ترین روش‌های تشخیصی برای شناسایی مقادیر بسیار کم عامل عفونی در نمونه‌های مشکوک و نیز تکثیر ژنوم است [۱۸]. در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار OLIGO7 آغازگرهای نوکلئوتیدی با توجه به توالی حفاظت شده انتهایی دو سر ژن‌های غیرساختمانی NSP1، 2، 3 (Neuroendocrine-Specific Protein) روتاویروس گاوی که در بانک ژنی NCBI

جدول ۱ توالی آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر روتاویروس گاوی سویه RF استاندارد و بازآرایی شده

قطعه ژنی	آغازگر مستقیم	آغازگر معکوس
NSP1	5'-GCTTTTTTATGAAAAGTCTTGTGG-3'	5'-GTTACATTTTATGCTGCCTAG-3'
NSP2	5'-CGTCTCAGTCGCCGTTTCG-3'	5'-GGTCACATAAGCGCTTCAATT-3'
NSP3	5'-ATTTAATGCTTTTCAGTGGTTGATGC-3'	5'-GGTCACATAACGCCCTATAGCC-3'

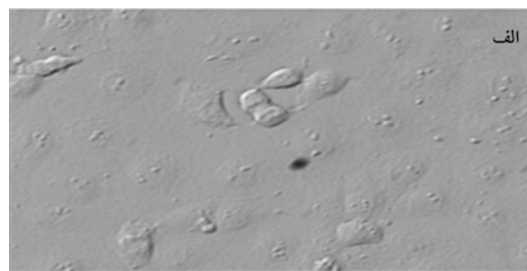
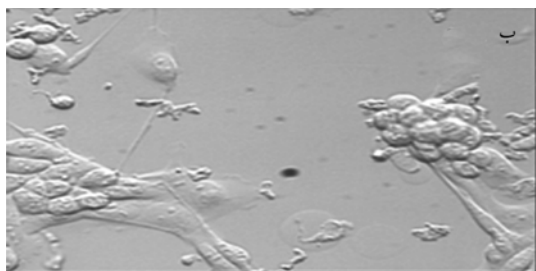
تولید روتاویروس گاوی بازآرایی شده از طریق تکثیر ویروس با نسبت بالای عفونت‌زایی

بازآرایی شده در سلول‌ها است. علایم تخریب سلولی برای هر دو ویروس استاندارد و بازآرایی شده یکسان بود، به عبارت دیگر طی فرآیند بازآرایی، در فنوتیپ تکثیر ویروس تغییری ایجاد نمی‌شود. کشت با شرایط یکسان سه بار تکرار شد و نتایج مشابه در هر بار نشان داده شد (شکل ۱).

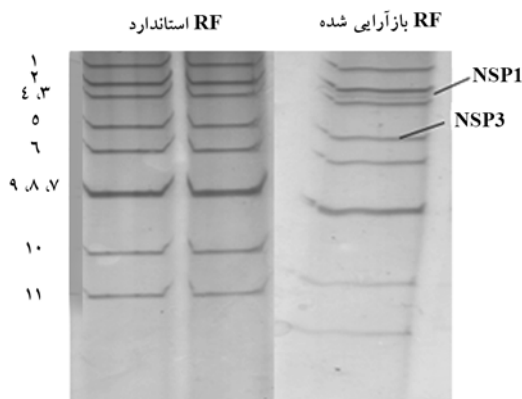
نتایج

کشت سلول و تکثیر ویروس

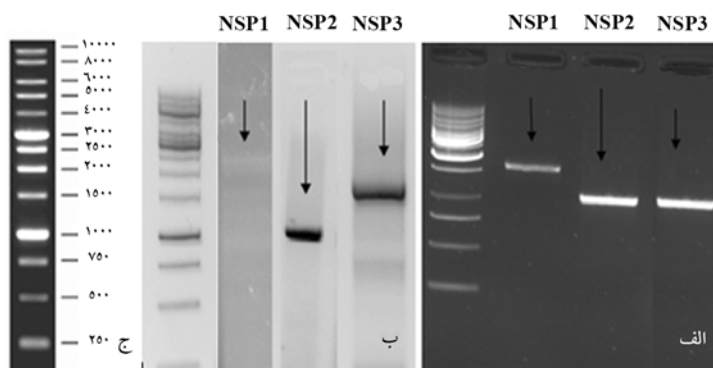
آثار تخریب سلولی به صورت کنده شدن سلول‌ها از بستر مشاهده می‌شود که نشان دهنده تکثیر ویروس استاندارد و



شکل ۱ (الف) وضعیت طبیعی سلول MA-104، (ب) وضعیت سلول پس از تلقیح روتاویروس گاوی



شکل ۲ الگوی ژنومی استاندارد و بازآرایی شده RNA روتاویروس در ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره



شکل ۳ (الف) الکتروفورز حاصل از تکثیر قطعات استاندارد، (ب) الکتروفورز حاصل از قطعات بازآرایی شده، (ج) نشانگر ۱ کیلو بایز SM0311

استخراج RNA ویروس و تجزیه و تحلیل الکتروفورز

ژنوم ویروس‌های استاندارد و بازآرایی شده RF استخراج و توسط ژل پلی آکریل آمید ۱۰ درصد و رنگ‌آمیزی نیترات نقره بررسی شد. حضور الگوی ژنومی غیرطبیعی در مقایسه با وضعیت استاندارد، وقوع بازآرایی در دو قطعه NSP1 و NSP3 را نشان داد که به صورت افزایش طول قطعه در اثر بازآرایی و مهاجرت قطعات ژنی NSP1 و NSP3 به بالای ژل بود. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود قطعه NSP1 بین دو قطعه ۳ و ۴ و قطعه NSP3 در جایگاه قطعه ۵ قرار گرفته است (شکل ۲).

تکثیر ژن‌ها به روش PCR

محصولات PCR در کنار نشانگر ژنومی در ژل آگارز ۱/۵ درصد با ژل رد (Red Gel) رنگ‌آمیزی و جدا شد. بدین ترتیب و با در نظر گرفتن الگوی ژنومی طبیعی روتاویروس گاوی، بازآرایی در این ویروس برای قطعات ۵ و ۷ که به ترتیب پروتئین‌های غیرساختمانی NSP1 و NSP3 را کد می‌کند، شناسایی شد. در این مطالعه قطعات نوترتیب (بازآرایی شده) بزرگ‌تر از قطعه طبیعی بود و در مقایسه با ویروس با ژنوم طبیعی که به عنوان کنترل است، تکثیر مناسبی در PCR نداشت (شکل ۳).

تعیین توالی و تجزیه و تحلیل نتایج

قطعات بازآرایی شده ۵ و ۷ به طور ویژه و در مقایسه با قطعات استاندارد تشخیص داده شد. در این مطالعه براساس الگوی الکتروفورزی و در نتیجه بازآرایی، قطعه ۵ کد کننده پروتئین NSP1 به اندازه تقریباً ۵۰۰ نوکلئوتید و قطعه شماره ۷ کد کننده پروتئین NSP3 به اندازه تقریباً ۴۰۰ نوکلئوتید در طول توالی افزایش نشان داد. با استفاده از برنامه BLAST، توالی‌های به دست آمده بررسی شد و وقوع بازآرایی به صورت افزایش طول قطعات نشان داده شد و بنابراین اختصاصی بودن آزمایش تأیید شد (جدول ۲).

جدول ۲ طول قطعات طبیعی و بازآرایی شده (براساس جفت‌باز)، قطعه ۵ کد کننده پروتئین NSP1 و قطعه شماره ۷ کد کننده پروتئین NSP3

قطعه ژنومی	قطعه طبیعی	قطعه بازآرایی شده
NSP1	۱۶۱۱	۲۰۰۰
NSP3	۱۱۰۴	۱۵۰۰

بحث

روتاویروس‌ها عامل اصلی گاستروانتریت حاد در نوزادان و دارای ۱۱ قطعه ژنوم RNA دو رشته‌ای هستند که در شرایط ویژه و با فراوانی متفاوت در برخی قطعات ژنومی آن‌ها بازآرایی اتفاق می‌افتد. براساس دانسته‌های محققان حاضر بازآرایی ژنوم پدیده‌ای ویژه در فرآیند تکثیر است که در تکامل و تنوع روتاویروس نقش دارد. بنابراین با بررسی بازآرایی اطلاعات زیادی در زمینه جزئیات ساختاری از ژن‌های بازآرایی شده، محصول و عملکرد آن‌ها و اهمیت تنوع سویه‌های روتاویروس مورد مطالعه به دست می‌آید. طی بازآرایی الگوی الکتروفورزی تغییر می‌کند و در مواردی به تبع آن، ساختار و عملکرد پروتئین‌های کد شده تغییر خواهد کرد [۱۹، ۲۰]. از آن جایی که مشخص شدن یک ویروس نوترتیب کاربردهایی در زمینه نوترتیبی و تولید واکسن‌های روتاویروسی دارد، باید بیشتر به آن توجه شود. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که RT-PCR، امکان تشخیص اختصاصی و حساس اشکال بازآرایی شده را فراهم می‌کند، بنابراین ابزار مفیدی برای تشخیص قطعات نوترتیب در کشت و نمونه‌های روتاویروسی است. تا به حال بازآرایی روتاویروس در ایران بررسی نشده است و این گزارش برای اولین بار، بازآرایی در شرایط تکثیر ویژه ویروسی و در کشت سلولی با نسبت عفونت‌زایی بالا را نشان می‌دهد. در این تحقیق برای افزایش تیتراژ، ویروس با نسبت‌های عفونت‌زایی مختلف، پاساژهای متوالی داده شد تا تیتراژ بهینه ویروس به دست آید. برای بررسی الگوی ژنومی ویروس از الکتروفورز استفاده شد و طی بررسی‌های انجام شده قطعات بازآرایی شده نشان داده شد. طی این بررسی‌ها دو باند ژنومی به بالای ژل مهاجرت داشت که افزایش وزن

تولید روتاویروس گاوی بازآرایی شده از طریق تکثیر ویروس با نسبت بالای عفونت‌زایی

طور عمدۀ برای قطعات ژنومی ۵، ۶، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۱ توصیف کرده و فرآیند بازآرایی را به صورت تکثیر جزئی توالی در این قطعات و به کمک PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) و RT-PCR بیان نموده‌است. در این مطالعات فرضیه‌هایی در رابطه با مکانیسم‌های بروز بازآرایی، مانند حضور توالی‌های ویژه یا عملکرد آنزیم پلیمرز ویروسی مطرح و بر اهمیت مطالعه بیشتر این فرآیند با توجه به وقوع آن در کودکان با نقص سیستم ایمنی و نیز شرایط ویژه آزمایشگاهی تأکید شده است و نقش آن در ایجاد جهش یافته‌های ویروسی و جایگزین شدن ویروس وحشی توسط این ذرات و نیز کاربرد آن‌ها در تولید واکسن مورد توجه قرار گرفته است [۳، ۸، ۲۴]. باید توجه نمود که بازآرایی‌های ژنوم به عنوان وقایع نوترکیبی، توسط تعیین توالی می‌تواند به خوبی مطالعه و توصیف شود. به این ترتیب توسعه و فراهم بودن روش‌های تکثیر و مطالعه ژنوم برای شناسایی و تشخیص و درک بهتر سویه‌های ویروسی با ترکیب ژنومی متفاوت که درون زمینه‌ای از ویروس‌های استاندارد پدیدار می‌شوند و نیز محصولات ژنومی آن‌ها که برای تشخیص آن‌ها ابزارهای قوی از جمله آنتی‌بادی‌های خنثی کننده در دسترس نیست، دارای اهمیت است [۸، ۱۱، ۲۴].

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد رشته ویروس‌شناسی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه انجام شده است.

مولکولی حاصل از تکثیر توالی در این قطعات را نشان می‌داد. با مطالعه متون مربوط به بازآرایی و نیز انجام الکتروفورز برای ژنوم استخراج شده ویروس‌های استاندارد و بازآرایی شده، فرآیند بازآرایی به طور ویژه در قطعات ۵ و ۷ در مقایسه با الگوی ژنومی استاندارد استفاده شده به عنوان کنترل، تشخیص داده شد. سپس به منظور مطالعه دقیق‌تر ژنوم‌های ویروس استاندارد و بازآرایی شده توسط روش RT-PCR تکثیر شد که علاوه بر تأیید وقوع بازآرایی، نشان داده شد که قطعات بازآرایی شده تکثیر ضعیف‌تری دارد. با استفاده از روش RT-PCR هر دو مورد بازآرایی به صورت افزایش توالی به اندازه تقریباً ۵۰۰ نوکلئوتید مربوط به قطعه ۵ کد کننده پروتئین NSP1 و به اندازه تقریباً ۴۰۰ نوکلئوتید برای قطعه شماره ۷ کد کننده پروتئین NSP3 را تأیید شد. در این تحقیق روتاویروس بازآرایی شده بدون هیچ‌گونه فشار انتخابی در کشت سلولی MA-104 به دست آمد. با توجه به عدم امتیاز رشد در کشت سلول برای ویروس بازآرایی شده در مقایسه با ویروس استاندارد که در سایر مطالعات اثبات شده است و در تحقیق حاضر نیز مشاهده شد، فرض بر این است که قطعات بازآرایی شده به طور انتخابی و تفریقی در ذرات ویروسی وارد می‌شود [۸، ۲۱-۲۳]. بنابراین مطالعه بیشتر قطعات تغییر یافته و به طور کلی فرآیند بازآرایی به منظور توسعه ابزارهای قوی از جمله آنتی‌بادی‌های خنثی کننده، ساخت واکسن زنده ضعیف شده داری ژن‌های هدف خاص از طریق ژنتیک معکوس و به خصوص ساخت واکسن‌های نوترتیب و دارای قطعه یا قطعات نوترکیب لازم و ضروری به نظر می‌رسد. سایر مطالعات بازآرایی را به شیوه‌ای مشابه با تحقیق حاضر و به

منابع

[1] Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM (editors). Fields Virology. 5th ed, vol. 2, Chapter 53, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007; p: 1918-32.

[2] Graham A, Kudesia G, Allen AM, Desselberger U. Reassortment of human rotavirus possessing genome rearrangements with bovine rotavirus: evidence for host cell selection. J gen Virol 1987; 68(Pt 1): 115-22.

- [3] Hundley F, Biryahwaho B, Gow M, Desselberger U. Genome rearrangements of bovine rotavirus after serial passage at high multiplicity of infection. *Virology* 1985; 143(1): 88-103.
- [4] Desselberger U. Genome Rearrangement of Rotaviruses. In: Marmorosch K, Murphy FA (editors). *Advances in Virus Research*. vol. 46, New York: Academic Press, 1996; p: 71-93.
- [5] Zuccotti G, Meneghin F, Dilillo D, Romanò L, Bottone R, Mantegazza C, Giacchino R, Besana R, Ricciardi G, Sterpa A, Altamura N, Andreotti M, Montrasio G, Macchi L, Pavan A, Paladini S, Zanetti A, Radaelli G. Epidemiological and clinical features of rotavirus among children younger than 5 years of age hospitalized with acute gastroenteritis in Northern Italy. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 218.
- [6] Ramani S, Iturriza-Gomara M, Jana AK, Kuruvilla KA, Gray JJ, Brown DW, Kang G. Whole genome characterization of reassortant G10P[11] strain (N155) from a neonate with symptomatic rotavirus infection: Identification of genes of human and animal rotavirus origin. *J Clin Virol* 2009 45(3): 237-44.
- [7] Dolan KT, Twist EM, Horton-Slight P, Forrer C, Bell LM Jr, Plotkin SA, Clark HF. Epidemiology of rotavirus electropherotypes determined by a simplified diagnostic technique with RNA analysis. *J Clin Microbiol* 1985; 21(5): 753-8.
- [8] Troupin C, Dehe´e A, Schnuriger A, Vende P, Poncet D, Garbarg-Chenon A. Rearranged genomic RNA segments offer a new approach to the reverse genetics of rotaviruses. *J Virol* 2010; 84(13): 6711-9.
- [9] Matsui SM, Mackow ER, Matsuno S, Paul PS, Greenberg HB. Sequence analysis of gene 11 equivalents from "short" and "super short" strains of rotavirus. *J Virol* 1990; 64(1): 120-4.
- [10] Manual of rotavirus detection and characterization methods: WHO Press. 2009; http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/who_ivb_08.1_7_eng.pdf
- [11] Taniguchi K, Komoto S. Genetics and reverse genetics of rotavirus. *Curr Opin Virol* 2012; 2(4): 399-407.
- [12] Teimoori A, Soleimanjahi H, Pourasgari F. Comparison of Rotavirus RF Strain and HSV-1 Titration by CCID50% and Plaque Assays. *MJMS* 2012; 15(2): 35-45. (Persian)
- [13] Arnold M, Patton JT, McDonald SM. Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. *Curr Protoc Microbiol* 2009; Chapter 15: Unit 15C.3.
- [14] Benureau Y, Huet JC, Charpilienne A, Poncet D, Cohen J. Trypsin is associated with the rotavirus capsid and is activated by solubilization of outer capsid proteins. *J Gen Virol* 2005; 86(Pt 11): 3143-51.
- [15] Gray J, Desselberger U. Rotaviruses methods and protocols. In: Walker JM (editor). *Methods in molecular medicine*. vol. 34, New Jersey: Humana Press, 2000; p: 1-258.
- [16] Gilbert JM, Greenberg HB. Rotavirus entry into tissue culture cells. *Methods Mol Med* 2000; 34: 67-77.
- [17] Agbalika F, Hartemann P, Foliguet JM. Trypsin-treated Ma-104: a sensitive cell line for isolating enteric viruses from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47(2): 378-80.

تولید روتاویروس گاوی بازآرایی شده از طریق تکثیر ویروس با نسبت بالای عفونت‌زایی

- [18] Maan S, Rao S, Maan NS, Anthony SJ, Attoui H, Samuel AR, Mertens PP. Rapid cDNA synthesis and sequencing techniques for the genetic study of bluetongue and other dsRNA viruses. *J Virol Methods* 2007; 143(2): 132-9.
- [19] Tian Y, Tarlow O, Ballard A, Desselberger U, McCrae MA. Genomic concatemerization/deletion in rotaviruses: a new mechanism for generating rapid genetic change of potential epidemiological importance. *J Virol* 1993; 67(11): 6625-32.
- [20] Gault E, Schnepf N, Poncet D, Servant A, Teran S, Garbarg-Chenon A. A Human Rotavirus with Rearranged Genes 7 and 11 Encodes a Modified NSP3 Protein and Suggests an Additional Mechanism for Gene Rearrangement. *J Virol* 2001; 75(16): 7305-14.
- [21] Schnepf N, Deback C, Dehee A, Gault E, Parez N, Garbarg-Chenon A. Rearrangements of Rotavirus Genomic Segment 11 Are Generated during Acute Infection of Immunocompetent Children and Do Not Occur at Random. *J Virol* 2008; 82(7): 3689-96.
- [22] Mattion NM, Bellinzoni RC, Blackhall JO, Estes MK, Gonzalez S, La Torre JL, Scodeller EA. Genome rearrangements in porcine rotaviruses: biochemical and biological comparisons between a supershort strain and its standard counterpart. *J Gen Virol* 1990; 71(Pt 2): 355-62.
- [23] Pedley S, Hundley F, Chrystie I, McCrae MA, Desselberger U. The genomes of rotaviruses isolated from chronically infected immunodeficient children. *J Gen Virol* 1984; 65(Pt 7): 1141-50.
- [24] Ward RL, McNeal MM, Steele AD. Why does the world need another rotavirus vaccine? *Ther Clin Risk Manag* 2008; 4(1): 49-63.