View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Aquatic Commons

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی

موسسه تحقیقات شیلات ایران

گزارش نهایی طرح تحقیقاتی

شناسایی ویروس ایجاد کننده سندرم لکه سفید(WSSV) در میگوی پرورشی سفید هندی در ایران با استفاده از PCR

امیر مسعود صابری - بهرام کاظمی

همکاران : محمد افشارنسب- مژگان بنده پور- الهام غیور

(۱۳۸۶)

وزارت جهادکشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
موسسه تحقیقات شیلات ایران
بخش بیماریهای آبزیان

- **عنوان طرح :** شناسایی ویروس ایجاد کننده سندرم لکه سفید(wssv) در میگوی پرورشی سفید هندی در ایران با استفاده از PCR
- **شماره مصوب طرح :** ۱۱-۰۷۱۰۱۳۶۰۰۰-۸۲
- **نام ونام‌خانوادگی مجری/مجریان :** امیر مسعود صابری - بهرام کاظمی
- **نام‌و نام‌خانوادگی همکاران :** محمد افشارنسب- مژگان بنده پور- الهام غیور
- **نام‌و نام‌خانوادگی مشاور(ان):** -
- **محل اجرا :** تهران
- **تاریخ شروع :** ۱۳۸۳
- **مدت اجرا:** ۲ سال و ۶ ماه
- **ناشر:** موسسه تحقیقات شیلات ایران
- **شمارگان(تیتراژ):**
- **تاریخ انتشار:** ۱۳۸۶

فهرست مندرجات

چکیده : ۱

واژه های کلیدی : ۲

مقدمه : ۳

مشخصات بیماری و ویروس آن: ۵

دلایل انتخاب طرح : ۷

مواد و روشها: ۸

نمونه های کلینیکی : ۸

آماده سازی نمونه ها واستخراج DNA: ۸

طراحی پرایمر: ۱۰

شرایط واکنش PCR : ۱۳

الکتروفورز وردیابی محصول PCR: ۱٤

نمونه گذاری و انجام الکتروفورز: ۱۵

کنترل آزمایشات ۱٦

یافته ها : ۱۷

بحث: ۲۰

زمینه های پیشنهادی جهت تحقیقات آینده : ۲۷

تقدیر و تشکر : ۲۷

منابع ۳۲

چکیده :

در این تحقیق نمونه های مشکوک به بیماری و سالم مورد بررسی قرار گرفتند . از آنجائیکه ویروس WSS جزء ویروسهای DNA دار است از نمونه های میگوی آلوده DNA استخراج گردید وژنوم ویروس توسط واکنش PCR ردیابی شد. توالی کامل ژنوم ویروس WSS ازاینترنت بدست آمده وبا نرم افزارDNAsis دو جفت پرایمر ازقسمت **VP24** ژن ویروس برای Nested PCR طراحی شد. پس ازطراحی این پرایمرها با جستجودربانک ژن و تایید اختصاصی بودن آنها جهت سنتز سفارش داده شد و سنتزگردیدند. همچنین بمنظور حساسیت بیشترروش تشخیص وکنترل واکنش در مراحل کار جفت سوم پرایمر از قسمت **VP24** ژن ویروس طراحی شد که محصول PCR آنها کوچکتر از پرایمرهای قبلی است.

یک جفت پرایمر نیز برای ژن **18**SrRNA میزبان طراحی گردید تا بعنوان House keeping gene همیشه در واکنش PCR نمونه های مثبت و منفی وجودداشته باشد. متعاقب استخراج DNA و بررسی کمی و کیفی آن ، واکنش Nested PCR همراه با کنترل انجام گرفت.جمع آوری و ارسال نمونه ها از استانهای خوزستان و بوشهر در چند نوبت انجام گردید. DNA ویروس جمعا در ۲۳نمونه تکثیرشد و تعداد۹نمونه منفی بودند.

به منظور انجام آزمایشات بعدی و همچنین ارائه روشی که بتوان در همه آزمایشگاهها با اطمینان ویروس فوق را ردیابی نمود محصول بدست آمده ، ترادف یابی شد وسپس ترادف مذکور در بانک ژن با نرم افزار Nucleotid Blast آزمایش گردید و مشخص شد که ژن تکثیر شده مربوط به ویروس مورد نظر میباشد اما اختلافاتی نیز با سویه های گزارش شده در بانک ژن نیز دارد. ژن مذکور بعنوان ویروس ایران در بانک ژن با شماره Accession DQ196431 ثبت شده است. این ژن با ژنها ی موجود در بانک

ژن ۹۷٪ شباهت دارد. ژن WSV406 هم تعیین ترادف شده و به بانک ژن ارائه گردیده است این ژن با ژنهای موجوددر بانک ژن ۹۹٪ شباهت دارد.

محصول PCR درپلاسمید کلون شد وصحت کلونینگ نیز آزمایش و تایید گردیده است. این پلاسمید نوترکیب نیز بعنوان کنترل داخلی PCR مورد استفاده قرار میگیرد.

واژه های کلیدی :

میگوی سفید هندی ، PCR ، white spot syndrom virus(WSSV) ، Penaeus indicus

مقدمه :

از زمان شروع تکثیر و پرورش میگو در سال ۱۹۷۰ تاکنون این صنعت بسرعت و در حجم بالائی توسعه یافته است ، بطوریکه بیش از ۵۰ کشور قادر به صادرات محصولات قابل توجهی از میگوهای پرورشی هستند. در این میان میلیاردها دلار سرمایه گذاری و صدهزار شغل جدید بصورت مستقیم و غیر مستقیم با درآمد بالای ارزآوری بویژه برای کشورهای درحال توسعه به همراه داشته است . اما پیدایش و بروز برخی بیماریهای ویروسی در دهه ۱۹۹۰ توسعه پایدار و ادامه رشد این صنعت را در برخی از کشورها بویژه کشورهای آسیای جنوب شرقی با مشکلات جدی مواجه نمود. اولین بیماری ویروسی در سال ۱۹۷٤ توسط کوچ (Couch) در خلیج مکزیک و از میگوی *penaeus dourorum* گزارش گردیده است و آن را بیماری Baculovirus penaei (BP) نامگذاری نمود و بعدا"سایر بیماریها از جمله بیماری مهم(MBV)baculovirus *Penaeus monodon* نیزگزارش گردیده است (Lightner, 1983).

بیماری لکه سفید (white spot disease) که بروز آن از سال ۱۹۹۱ مشاهده گردید تاکنون میلیونها دلار خسارت اقتصادی در برخی از کشورها را بوجود آورده و موجبات مشکلات اجتماعی ناشی از بیکاری هزاران نفر گردیده است .(Takahashi *et al*, 1994; Flegel etal,1996).

بیماری لکه سفید یا(WSD) White spot disease یا سندرم لکه سفید White spot syndrome (WSS) کلیه بیماریهای میگو را تحت‌الشعاع خود قرار داده و باعث تلفات سنگینی در مزارع میگوهای پرورشی در قاره آسیا گردید.

(Wang *et al*., 1995, Takahashi *et al*., 1994, Flegel *et al*. 1996).

این بیماری با ایجاد لکه‌های سفید در روی کاراپاس میگوهای پرورشی ، جدا شدن سریع کوتیکول از لایه اپیدرم ، خالی بودن معده و روده ، بزرگ و زرد و شکننده شدن هپاتوپانکراس ، قرمز شدن اندامهای حرکتی و مرگ و میر شدید که معمولاً در طی ۲ تا ۷ روز به ۷۰ تا ۱۰۰٪ می‌رسد مشخص می‌گردد . این بیماری را بنام نکروز بافتهای هیپودرم و هماتوپوتیک، Baculoviral necrosis hypodermal and haematopoitic(HHNBV) نیزمی‌نامند. در کشور ژاپن بنام Rod-Shaped unclear virus of penaeus japonicus (RVPJ) و در کشور تایوان بنام Systemic ectodermal and mesodermal beculovirus یا (SEMBV) نامگذاری گردیده است. در سال ۱۹۹۶ دکتر Lightner نام بیماری را (WSS) White spot syndrome نامگذاری نمودند.

میگوهای خانواده پنائیده از جمله میگوی Penaeus monodon ، P.orientalis، P.indicus ، P.merguiensis، P.penicillatus، P.Semisulcatus به صورت طبیعی و سایر گونه‌های میگو نیز بصورت آزمایشی آلوده‌گی به این بیماری را نشان داده‌اند. همچنین این بیماری دارای ناقلین متعددی می‌باشد که مهمترین ناقلین آن سخت‌پوستان Crustacea بالاخص خرچنگها می‌باشند.

در ایران نیز با توجه به گسترش روزافزون مزارع پرورش میگو ، خطرات ناشی از این بیماری در حال افزایش است و مواردی از شیوع آن گزارش شده است که نمونه آن گزارش شیوع بیماری در تیرماه سال ۸۱ در منطقه چوئیبده آبادان است (تخم افشان و همکاران ، ۱۳۸۲).

در حال حاضر مطالعات گسترده‌ایی در زمینه شناسایی و نحوه مبارزه و ریشه‌کنی این بیماری در جریان بوده و لازم است در ایران نیز تحقیقاتی در زمینه شناسایی دقیق عامل بیماری انجام شود تا بتوان تفاوت احتمالی آن را با سویه‌های سایر کشورها تعیین نمود. هدف از انجام این تحقیق عبارت بودند از:

۱- شناسایی و تعیین هویت ویروس ایجاد کننده بیماری سندرم لکه سفید (WSSV) در میگوی پرورشی سفید هندی در ایران

۲- تعیین ردیف بازهای نوکلئوتیدی ویروس ایجاد کننده بیماری در ایران

۳- مقایسه سویه ویروس ایجاد کننده بیماری در ایران با سویه های سایر کشورها.

جهت تشخیص عامل بیماری روشهای مختلف وجود دارد که بهترین آنها PCR است . البته روشهای دیگر مثل Western ، DNA hybridization،Transmission electron microscopy histopathology by H & E، blot assay نیز وجود دارد که جهت آزمایشات تکمیلی میتوان از آنها استفاده نمود . با تعیین هویت و شناسایی ردیفهای ژنوم عامل بیماری می‌توان زمینه تولید واکسنها و فرآورده‌های بیولوژیکی مورد نیاز جهت پیشگیری بیماری را فراهم نمود.

مشخصات بیماری و ویروس آن:

همچنانکه از نام بیماری مشخص است عفونت حاصله با پیدایش لکه های سفید در کوتیکول میگوهای مبتلا همراه با تلفات سنگین و ناگهانی تا ۱۰۰٪ است که ممکن است در طول ۷-۳ روز پس از تهاجم ویروس صورت گیرد.گاهی ممکن است علامت فوق کمتر قابل مشاهده باشد ولی تلفات سریع و ناگهانی و بسیار شدید است. در بسیاری مواقع بیماری از همه گیری بالائی برخوردار است.

هپاتوپانکراس میگوهای مبتلا به بیماری بزرگ و زرد رنگ شده ، اندامهای حرکتی و سطح بدن میگوها قرمز رنگ گردیده ، پوسته بدن میگوها نرم و براحتی قسمت کاراپاس از کوتیکول کنده می شود، میگوهای بیمار بی حال بوده و تمایلی به غذا خوردن نداشته و در کنارهای استخرها تجمع نموده و به مرور تلف می شوند (تخم افشان و همکاران ، ۱۳۸۲).

شکل شماره (۱) – لکه های سفید روی کاراپاس میگوی مبتلا به بیماری لکه سفید

در هیستو پاتولوژی تغییرات پاتولوژیکی ناشی از ویروس عامل لکه سفیددر میگوها موجب دژنرسانس سلولی در سطح وسیع ، هیپرتروفی شدید هسته ای ، حاشیه نشینی کرماتینها در بافتهای اکتودرمی و مزودرمی بویژه در زیر کوتیکول،اپیتلیوم پوست،اپی تلیوم آبشش، اپی تلیوم معده، بافتهای پیوندی ، عصبی و غدد آنتن می شود (تخم افشان و همکاران، ۱۳۸۲).

مطالعات انجام شده نشان می دهد که ویروس عامل بیماری قادر به آلوده نمودن و تهاجم به بسیاری از بافتهای میگو از جمله آبشش ها ، روده قدامی ، کوتیکول اپی درم، بافت همبند، عضلات ، قلب، سلولهای خونی (هموسیتها)، بافت عصبی و تخمدان می باشد(Wang *et al*., 1999)

مطالعات میکروسکوپیک بافتهای آلوده نشان می دهد که تغییرات سلولی در همه بافتهای مبتلا مشابه بوده بطوریکه در مراحل اولیه عفونت سلولهای حساس دچار هیپرتروفی هسته، تجزیه یا حذف هستک و حاشیه نشینی کروماتین می شوند. سپس در این سلولهای آلوده کنجیدگیهای داخل هسته ای ائوزینوفیلی بنام Cowdry type A inclusion body ظاهر می شود که بعدا" حالت بازوفیلی پیدا کرده و کنجیدگیهای متراکم شده توسط یک ناحیه شفاف از کروماتین حاشیه جدا می گردد.

در مراحل بعدی عفونت با از هم گسیختن غشاء هسته ، ناحیه شفاف هسته با سیتوپلاسم در هم آمیخته می شوند و در مراحل انتهائی با تخریب سلول مبتلا ، هسته یا تمام سلول متلاشی و منجر به ایجاد فضاهای خالی در مقاطع بافتی می شود (Lightner, 1996;Wang *et al*.,1999 ;)(تخم افشان و همکاران، ۱۳۸۲)

در مطالعات مولکولی ویروس ایجاد کننده بیماری مشخص گردیده است که ویروس به صورت گرد و دارای پوشش بوده و اندازه آن ۳۸۰-۲۵۰ × ۱۲۰-۸۰ نانومتر و اندازه ژنوم آن bp ۳۰۰/۰۰۰ میباشد(vanHulten *et al*., 2001). ژنوم ویروس بصورت DNA دو رشته‌ایی (dsDNA) می‌باشد. تشخیص این ویروس با استفاده از PCR می‌باشد که از حساسیت بالایی برخوردار است.

دلایل انتخاب طرح :

عامل بیماری لکه‌های سفید (WSSV) دارای قدرت عفونت‌زایی بسیار بالایی برای اغلب گونه‌های میگوهای پرورشی خانواده پنایید ***(Penaeids)*** (مثل ***P.indicus , P. Japonicus, Penaeus monodon*** و...) می‌باشد در سال‌های اخیر در اثر گسترش بسیار وسیع بیماری در اغلب کشورهای دنیا و بخصوص کشورهای آسیایی ، تلفات و خسارات بسیار سنگینی به مزارع پرورش میگو وارد شده است. در ایران نیز با توجه به گسترش روزافزون مزارع پرورش میگو ، خطرات ناشی از این بیماری در حال افزایش است و مواردی از شیوع آن گزارش شده است که نمونه آن گزارش شیوع بیماری در تیرماه سال ۸۱ در منطقه چوبیده آبادان است .

در حال حاضر مطالعات گسترده‌ایی در زمینه شناسایی و نحوه مبارزه و ریشه‌کنی این بیماری در جریان بوده و لازم است در ایران نیز تحقیقاتی در زمینه شناسایی دقیق عامل بیماری انجام شود تا بتوان تفاوت احتمالی آن را با سویه‌های سایر کشورها تعیین نمود.

جهت تشخیص عامل بیماری روشهای مختلف وجود دارد که بهترین آنها PCR است . البته روشهای دیگر مثل DNA hybridization،Transmission electron microscopy ، histopathology by H & E، Western blot assay نیز وجود دارد که جهت آزمایشات تکمیلی میتوان از آنها استفاده نمود . با تعیین هویت و شناسایی ردیفهای ژنوم عامل بیماری می‌توان زمینه تولید واکسنها و فرآورده‌های بیولوژیکی مورد نیاز جهت پیشگیری بیماری را فراهم نمود.

مواد و روشها:

نمونه های کلینیکی :

از آنجاییکه در این طرح بررسی اپیدمیولوژیک بیماری مد نظر نمی‌باشد ، لذا مدل آماری جهت تعیین محل‌های نمونه‌برداری و تعداد نمونه‌ها پیش‌بینی نگردید . لیکن جهت افزایش احتمال دریافت نمونه‌های مثبت بیماری ، از طریق موسسه تحقیقات شیلات کشور با واحدهای ارایه دهنده خدمات بهداشتی به کارگاههای پرورش میگو مثل سازمان دامپزشکی مناطق هماهنگی گردید تا در صورت مشاهده موارد مشکوک بیماری ، مراتب اعلام گردد. سپس با مراجعه به محل کارگاه‌ها وضعیت بیماری از نظر علایم ظاهری و اطلاعات مقدماتی مربوط به آن جمع‌آوری گردید. نمونه‌هاشامل اندام کامل میگو بودند که در چند نوبت (جمعا ۳۲ عدد) تعدادی از آنها در الکل حمل شدند و مابقی به صورت فریز شده به آزمایشگاه ارسال شدند.

آماده سازی نمونه ها واستخراج DNA :

۱- مقدار ۵۰ میلی گرم از مخلوط بافت نرم وسخت میگو در میکروفیوژ ریخته شد و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده به آن اضافه گردید.

۲- پروتئیناز K با غلظت نهایی ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر به ان اضافه شد و یک شب در ۵۵ درجه قرار گرفت .

۳- لوله حاوی واکنش مدت ۱۰ دقیقه جوشانیده شد.

٤- مدت ۵ دقیقه با ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا پروتئینها رسوب کنند.

۵- مایع شفاف رویی که حاوی DNA میباشد به لوله جدید منتقل شد.

٦- مقدار ۱۵۰ میکرولیتر فنل متعادل شده به ان اضافه شد و بخوبی سوسپانسیون گردید.

۷- مدت ۳ دقیقه با ۱۲۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ شد.

۸- مایع شفاف رویی که حاوی DNA بود به لوله جدید منتقل شد.

۹- مقدار ۱۵۰ میکرولیتر کلرفرم به ان اضافه شد ومانند مرحله قبل سانتریفیوژ شد وسپس مایع شفاف رویی به لوله جدید منتقل گردید.

۱۰- مقدار۱۵ میکرولیترسدیم استات ۳ مولارو دوبرابرحجم ان(۳۰۰ میکرولیتر) الکل مطلق اضافه شد ومدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دوردردقیقه سانتریفیوزشد تا DNA درته لوله رسوب نمود.

۱۱- الکل رویی حذف شد و پس از خشک شدن لوله , برای شستشوی نمکهای باقیمانده در DNA مقدار ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ اضافه شد.

۱۲- مختصری ورتکس شد و مدت دودقیقه با شرایط قبل سانتریفیوژ انجام گرفت.

۱۳- الکل حذف شد و لوله حاوی DNA در ۳۷ درجه قرار گرفت تا خشک شود.

۱٤- به هر لوله مقدار ۵۰میکرولیتر اب دیونیزه اضافه شد.

برای تکثیرDNA مقدار۱۰ میکرولیتر آن روی ژل اگارز ۱درصد الکتروفورز شد و مقدار ان تخمین زده شد سپس برای واکنش PCR مقدار ۱ میکروگرم آن استفاده شد. مواد و شرایط انجام PCR به این شرح می باشد:

طراحی پرایمر:

توالی کامل ژنوم ویروس WSS ازاینترنت بدست آمده وبا نرم افزارDNAsis دو جفت پرایمر ازقسمت VP24 ژن ویروس برای Nested PCR طراحی شده است. پس ازطراحی این پرایمرها با جستجودربانک ژن و تایید اختصاصی بودن آنها جهت سنتز سفارش داده شده و سنتزگردیده اند. این پرایمرها طوری طراحی شده اند که قسمتی از ژنوم (VP24) همه گونه های ویروس مذکور توسط آنها شناسایی و تکثیر میشود و نهایتا با روش RFLP و با تعیین توالی مستقیم DNA محصول PCR گونه های ویروس از یکدیگر تفکیک می گردند.

بمنظور حساسیت بیشتروروش تشخیص وکنترل واکنش در مراحل کار ، جفت سوم پرایمر از قسمت VP24 ژن ویروس طراحی شد که محصول PCR آنها کوچکتر از پرایمر های قبلی است . یک جفت پرایمر نیز برای ژن 18 SrRNA میزبان طراحی گردید تا بعنوان House keeping gene همیشه در واکنش PCR نمونه های مثبت و منفی وجودداشته باشد. پرایمرها توسط شرکت Oligo Gene set فرانسه سنتزشدند.

پرایمرهای میزبان:

این پرایمر ها تعداد ۸۰۹ نوکلئو تید از ژن 18SrRNA میگو را تکثیرمیکنند

Shri F 5`- GTA GGT TAA ACG CCT ACA ATG G-3`
Shri R 5`- CCG GAA CTC AAA GAC TTT GGT T -3`

پرایمر های شناسایی :

- پرايمر هاي F1 و R1 (PCR اول) تعداد ۷۸۵ نوكلئوتيد از ژن VP24ويروس را تكثير مي‌كنند

WssF1 5`- CAC CTG GGT TTG ACT ACA ATA -3`

WssR1 5`-TCT GTT TTT TTC TCT CAT GAC -3`

پرايمرهاي F2و R2(Nested PCR) كه تعداد ۴۱۲ نوكلئوتيد را از محصول PCR اول را تكثير مي‌كنند

Wss F2 5`- TCC AAA CAC AAG TGT GTT GAT C-3`

Wss R2 5`- AAG ACG CCT ACC CTG TTG AAT C-3`

پرايمر هاي F3 و R3 تعداد ۷۰۶ نوكلئوتيد از محصول PCR اول را تكثير مي كنند (مي توان بجاي پرايمر هاي F1و R1 ازاين پرايمرها استفاده نمود).

WssF3 5`- ATG AAT TTC AAG CTA CAA TG -3`

WssR3 5` -TAC AAC TTT CTT CAA AAT GC-3`

پرایمرهای Wss F2 و Wss R2 با یک مرحله PCR می توانند ویروس را شناسایی کنند اما اگر تعداد ویروس در بدن میزبان کم باشد ، می توان بصورت Nested PCR با پرایمر های WssF1 و WssR1 و یا WssF3 و WssR3 آنها را مورد استفاده قرار داد. در اینصورت حساسیت واکنش بالاتر میباشد.

لازم به ذکر است که محصول PCR پرایمر های WssF1 و WssR1 و یا WssF3 و WssR3 می توانند بعنوان Template (الگو) برای پرایمر های Wss F2 و Wss R2 استفاده شوند

شکل شماره ۲ : جایگاه پرایمرهای شناسائی در ساختمان ژن VP24

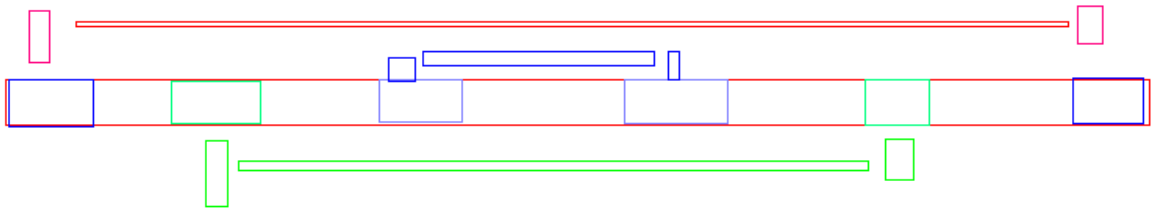
GGACTTTTTGCAAACACCTGGGTTTGACTACAATAAATCTTTCCCTAACAATGAAAGGTATAT
ATATGAATTTCAAGCTACAATGTAAATAATTGGTTAATAAAATAAAGGTATATTTTTAAAAA
ATGTGTTTATTTTTCCCCAACCTTAAACAGATCATTGCCAGGAGAAAATCGCATACTTAACAG
ATAATGCCTATTTGTATCATCGATGTCTTCGTCAAACGTTGCTCCAAACACAAGTGTGTTGAT
CCTATTTTTCTTCAAAACTGTTGGTTTGAAATATAATACAAATTTGTTAGCTGAAAATTCCCT
TCCTGTAGCATTTAGACCTGGAGACAGTGAAACAGAGTCCACTGTTATATCCCTCTTTGTATT
ATTGTATACTCTTGCATACAATTCTAATTCTTTAGATTCGGCTTTGTTTACATTTAGTGTGTGG
TCTCCGTCTCCAAGTAAAGATGTGAGGATTATGTCTCCTTTCTTTTTTACCAGTTCAGAATCG
GACGTTCCTTGGCCAGCTACATATACCTTTCCATAGTTCCTGGTTTGTAATGTGCCGTTTACA
AAGTTAAAGTGGTTTCCTCTAGCAACACCGTTAATGGTCAAGTTTATTATTTCAGATTCAACA
GGGTAGGCGTCTTTATCCTTCTTGTCCAATTTCTTGTTAAGTTCTATGTTGGTTACAACTATAG
ATATAACCACGAGTATCAATGTCAAACCCGCCAGTATAGCGGCGTAAACCCCCCACATGTGC
ATTTTGAAGAAAGTTGTACAAAGGTCATGAGAGAAAAAAACAGATATTAAAGTTTGTTATAT
TTTATTTAGTCGTAGAAATCAC

آبی : پرایمرهای F1 و R1

قرمز : پرایمرهای F3 و R3

سبز : پرایمرهای F2 و R2

شکل شماره۳ : جایگاه فرضی پرایمرها در ساختمان ژن VP24



اجزاء واکنش PCR :

DNA	2. µl (0.1µg)
Taq DNA polymerase	0.25 . µl (1.25 U)
10X PCR Buffer	3 . µl
MgCl2	1 . µl (1.5 mM)
dNTP mix	0.5 . µl (200. µM)
primers (F& R)	2 . µl (20 pmol each)
dH2O	21 .25 µl
Total volume	30 . µl

شرایط واکنش PCR :

برای واسرشته سازی(Denaturation) اولیه DNA هدف، واکنش مدت ۵ دقیقه دردمای ۹٤ درجه قرارداده شد سپس مراحل PCR (واسرشته سازی در۹٤ درجه بمدت ۳۰ ثانیه، اتصال(Annealing) پرایمرها ٥٦ درجه بمدت ۳۰ ثانیه و بسط(Extension) در۷۲ درجه بمدت ۳۰ ثانیه) ۳۰ سیکل تکرار شدند و نهایتا یک سیکل بمدت ۵ دقیقه واکنش در۷۲ درجه قرارداده شد.

مواقعی که DNA هدف درنمونه موردآزمایش کم باشد، برای جلوگیری ازبالا بردن مقدار DNA و مهار واکنش توسط پرایمرهای خارجی ، قطعه طویل‌تری همانندسازی می‌شود و از محصول PCR اول که بیشتر DNA هدف همانندسازی شده است یک واکنش دیگر با پرایمرهای داخلی انجام می‌گیرد. در این روش اختصاصیت و حساسیت PCR بالا می‌رود.

با برنامهٔ زیر واکنش طی ۳۰ سیکل انجام گرفت:

Denaturation	94ºC	۳۰ ثانیه
Annealing	56ºC	۳۰ ثانیه
Extension	72ºC	۳۰ ثانیه

الکتروفورز وردیابی محصول PCR :

جهت تأیید انجام کار باید محصول ایجاد شده رؤیت گردد، مشاهده DNA متعاقب الکتروفورز روی ژل آگارز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید امکان‌پذیر خواهد بود.

با توجه به تعدادنوکلئوتیدهای تشکیل‌دهنده ژن مورد آزمایش که ۷۰۶ bp می‌باشد از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده گردید.

بعد از تعیین حجم قالب ژل، پودر آگارز وزن شد. سپس آگارز را در بافر TBE × ۱ ( ) جوشانده شد تا خوب حل گردید و قبل از خنک شدن به ازای هر ۱۰ml ژل یک میلی‌لیتر از محلول ۱۰mg/ml اتیدیوم بروماید اضافه شد و در قالب ژل مخصوص ریخته شد و جهت ایجاد چاهک برای نمونه گذاری شانه

مناسب روی ان قرار گرفت بعد از بستن اگارز شانه را در آورده و ژل در داخل تانک مخصوص الکتروفورز قرار داده شدو توسط منبع تغذیه الکتروفورز انجام گرفت

1 × TBE = 89mM Trise Base, pH = 8, 89mM Boric Acid, 2.5mM EDTA, pH =8.

DNA به دلیل وجود گروه فسفات دارای بار منفی بوده و بنابراین رشته‌ها در یک میدان الکتریکی به سمت قطب مثبت حرکت می‌کنند. اتیدیوم بروماید بار مثبت دارد و به سمت قطب منفی حرکت می‌کند. در نتیجه تلاقی DNA و اتیدیوم بروماید، این ماده در بین رشته‌های DNA قرار می‌گیرد و با نور UV و به کمک دستگاه Uv transilluminator رنگ فلورسنت در محلی که باندهای DNA قرار دارد، دیده می‌شود. سپس از ژلی که قابل رویت گردیده عکس تهیه می شود.

نمونه گذاری و انجام الکتروفورز:

حدود ۱۰µl از محصول PCR را با ۱µl از بافر نمونه مخلوط کرده، در داخل چاهک ریخته شد. بافر نمونه حاوی ۵۰٪ ماده سنگین‌کننده مثل گلیسیرین یا ساکارز است تا نمونه حاوی DNA به خوبی داخل چاهک ریخته شود و همچنین حاوی ۲/ ۰ درصد از یک رنگ نشانه مانند بروموفنل‌بلو یا گزیلن سیانول می‌باشد. رنگ بروموفنل‌بلو در ژل ۱٪ همراه با ۵۰۰bp حرکت می‌کند.

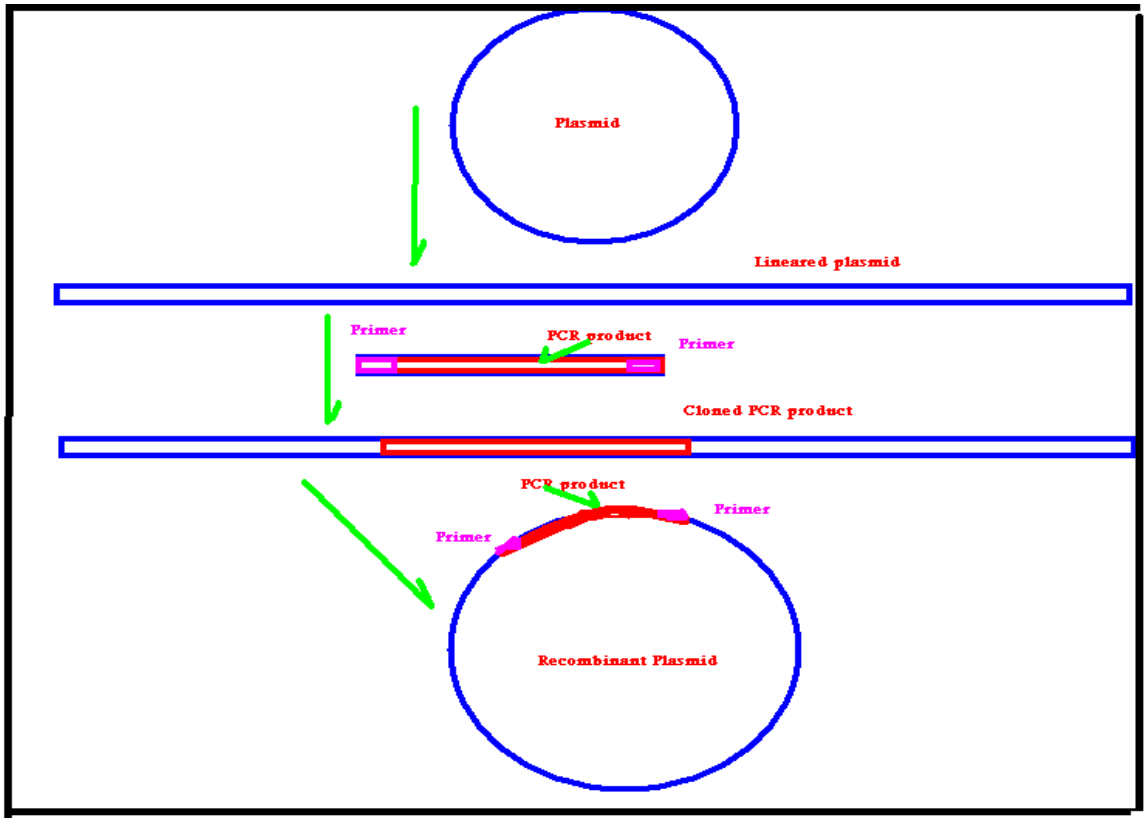
تانک الکتروفورز به منبع تغذیه وصل شد و مدت ۳۰ دقیقه با ۸۰ ولت و ٤٠mA الکتروفورز ادامه داشت در این موقع رنگ نشانه سه چهارم طول ژل را طی کرده بود. با استفاده ازدستگاه Transilluminator U.V با طول موج ۲٦۰ نانومتر، باندهای DNA مشاهده شدند. جهت اطمینان ازنظر تعداد نوکلئوتیدهای محصول PCR مارکرDNA هم در کنار محصول PCR الکتروفورز شد. از محصول PCR الکتروفورز شده روی ژل عکس تهیه گردید.

کنترل آزمایشات :

برای آزمایشات بعدی و همچنین ارائه روشی که بتوان در همه آزمایشگاهها با اطمینان ویروس فوق را ردیابی نمود، وجود کنترل لازم است برای اینکار محصول ترادف یابی شد وسپس ترادف مذکور در بانک ژن با نرم افزار Nucleotid Blast آزمایش گردید و مشخص شد که ژن تکثیر شده مربوط به ویروس مورد نظر میباشد اما اختلافاتی نیز با سویه های گزارش شده در بانک ژن نیز دارد. ژن مذکور بعنوان ویروس ایران در بانک ژن با شماره Accession DQ196431 ثبت شده است.

محصول PCR درپلاسمید کلون شده وصحت کلونینگ نیز آزمایش و تایید گردیده است. این پلاسمید نوترکیب نیز بعنوان کنترل داخلی PCR مورد استفاده قرار میگیرد.

کلونینگ ژن : انتهای `3 رشته های محصول PCR که نوکلئوتید A قرار دارد به کمک آنزیم لیگاز داخل Tvector (تهیه شده با پلاسمید Bluescript) کلون شد. محصول این واکنش در باکتری XL-1blue ترانسفرم گردیدو کلنی های باکتریایی با سیستم X-gal - IPTG غربالگری شدند. کلنی های سفید باکتری (حاوی پلاسمید های نوترکیب) انتخاب شدند ودر محیط کشت LB کشت داده شدند و پلاسمید به روش الکالین استخراج گردید

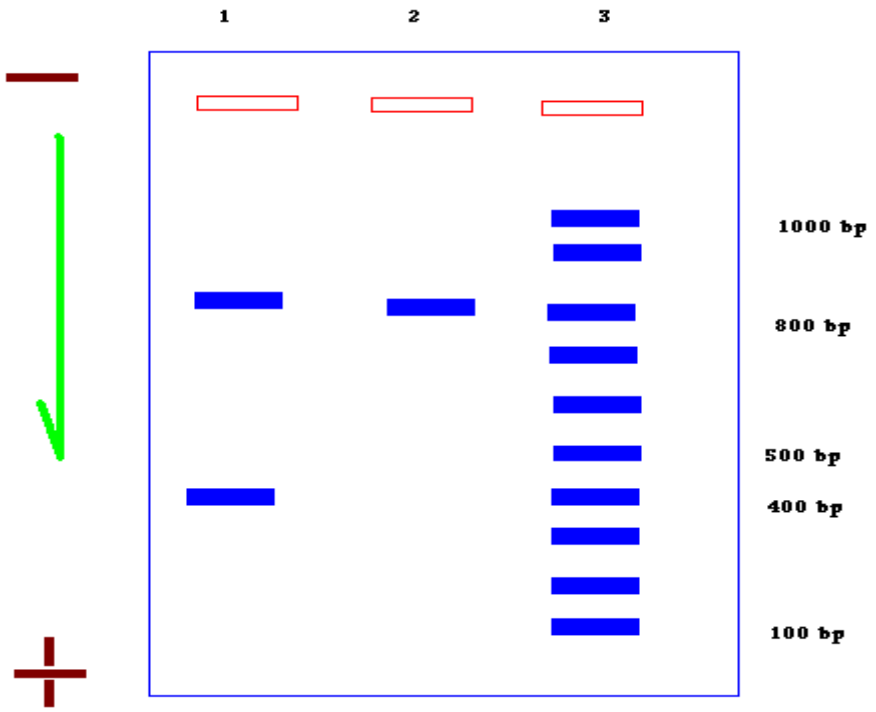


شکل شماره ٤ : مراحل تهیه کنترل داخلی PCR با استفاده از محصول PCR کلون شده در پلاسمید

یکی دیگر از راههای کنترل کار استفاده از پرایمر هایی است که قسمتی از DNA میزبان را تکثیرمیکننـد. برای ژن 18S ribosomal RNA میگو یک جفت پرایمر طراحـی گردیـد. روش کـار بـدین صـورت است که پرایمر ها ی مذکور در واکنش قرار میگیرند و همیشه بایـد محصـول PCR آنهـا روی ژل اگـارز مشاهده شود

یافته ها :

تعداد ۳۲ نمونه میگو از مزارع استانهای خوزستان و بوشهر صید شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. از نمونه های میگو DNA استخراج گردید. بعد از بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده واکـنش PCR همراه با کنترل و همچنین Nested PCR انجام گرفت. DNA ویروس در ۲۳ نمونـه تکثیرشـد و تعداد ۹ نمونه منفی بودند. شکل شماره ٥ الگوی الکتروفورزی محصول PCR را در نمونه های مثبـت و منفی نشان میدهد.



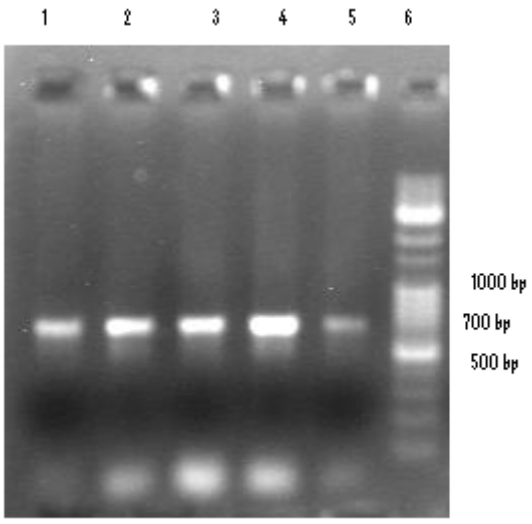
شکل شماره ۵ : الگوی الکتروفورز ی محصول PCR در نمونه های مثبت و منفی

ستون شماره ۱: نمونه مثبت

ستون شماره ۲: نمونه منفی

ستون شماره ۳: مارکر وزنی DNA

شکل شماره ٦محصول PCR نمونه هـای مثبـت را بـا پرایمرهـای مخصـوص PCR-RFLP نشـان میدهد.

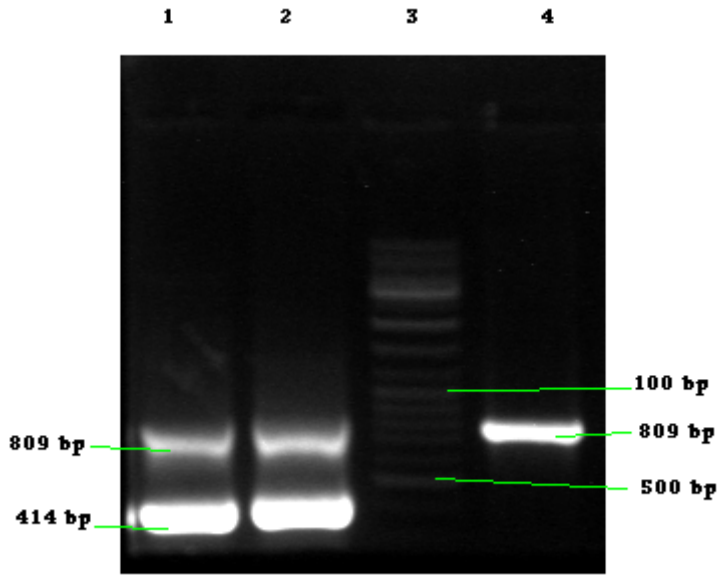


شکل شماره ٦ – الکتروفورز محصول PCR با پرایمر های مربوط تعیین گونه روی ژل اگارز

ستونهای ١,٢,٣,٤,٥ : محصول PCR نمونه های مثبت WSS

ستون ٦ : مارکر وزنی DNA

شکل شماره ٧ محصول PCR نمونه های عامل بیماری لکه سفید را در میگو در مقایسه با نمونه منفی نشان میدهد. در نمونه های مثبت هم محصول PCR ویروس عامل بیماری لکه سفید دیده می شود و هم محصول PCR ژن 18SrRNA میزبان را می توان مشاهده نمود. اما در نمونه های منفی فقط محصول PCR میزبان مشاهده میگردد.



شکل شماره ٧ : الکتروفورز محصول PCR با پرایمر های مربوط به شناسایی, روی ژل اگارز

ستون های شماره ١و٢ : محصول PCR نمونه مثبت و محصول PCR کنترل

ستون شماره ٣: مارکر وزنی DNA

ستون شماره ٤ : نمونه منفی (فقط محصول PCR کنترل در ان دیده میشود)

تعیین ترادف ژنوم ویروس:

تا کنون ژن VP24 ویروس ایران تعیین ترادف شده و با ACCESSION DQ196431 در بانک ژن به ثبت رسیده است . این ژن با ژنها ی موجود در بانک ژن ۹۷٪ شباهت دارد. ژن WSV406 هم تعیین ترادف شده و به بانک ژن ارائه گردیده و در حال سپری نمودن مراحل ثبت در بانک ژن میباشد. این ژن با ژنهای موجوددر بانک ژن ۹۹٪ شباهت دارد.

لازم به ذکر است که سکانس دو ژن (VP24 و WSV406) ویروس ایران با سکانسی که از ژنوم ویروس در بانک ژن موجود است مقایسه شده است.

بحث:

با توجه به تکثیرشدن ژنوم ویروس با PCR و تایید محصول PCR با ترادف یابی مستقیم, چنین بر می آید که وجود ویروس عامل بیماری لکه سفید در مزارع پرورش میگو در جنوب کشور حتمی می باشد و باید مسئولین در این مورد تصمیم گیری کنند. یکی از ابزارهای مهم مدیریت در این زمینه در دسترسی به روشی سریع و حساس جهت شناسایی بیماری در میگو میباشد. با جستجو در اینترنت در مورد شناسایی این ویروس در ایران تابحال فقط یک مقاله در مجله شیلات (۱) چاپ شده است که در این تحقیق شناسایی ویروس با کیت خارجی انجام گرفته است. تا کنون کیتهای مختلفی از کشورهای دیگر برای شناسایی ویروس عرضه شد است که همگی بر پایه تکثیرقسمتی از ژنوم ویروس با PCR طراحی شده اند.

یکی از نکاتی که در زمینه تشخیص بیماری باید در نظر داشت تغییرات ژنومی در گونه های ویروس می باشد (۱۱، ۱۵،۱۶،۲۰) . Wongteerasupaya وهمکاران تفاوت ایزوله های ویروس را در

تایلند نشان دادند و معتقدند که همه گیری های متفاوت با ویروسهای جدا شده با ساختمان ژنتیکی متفاوت اتفاق می افتد(۲۰).

روش تشخیص باید بتواند این نکته را در نظر داشته باشد که گونه های ویروس ممکن است اختلاف داشته باشند. تحقیق Dieu در ویتنام حاکی ازاین مسئله است که تغییر در ژنوم گونه های مختلف ویروس در این منطقه اتفاق افتاده است (3). در این تحقیق برای شناسایی ویروس از پرایمرهایی که بر اساس ژن VP24 طراحی شده اند استفاده شد. این ژن در بیماریزایی ویروس نقش دارد (۳). پیشنهاد می شود با تعداد نمونه بیشتری شناسایی ویروس توسط این پرایمرها با کیت خارجی مقایسه شوند. در صورتیکه نتایج آنها شبیه کیت خارجی باشد تهیه واستفاده از انها بعنوان کیت اسان تر از وارد کردن کیت خارجی می باشد. از طرف دیگر شناسایی ویروس با سیستمی که معرفی شد همراه دو نوع کنترل می باشد (یکی کنترل داخلی سیستم PCR که باید ژنوم میزبان حتما" امپلیفای بشود ودیگری کنترل داخلی که با روش مهندسی ژنتیک تهیه شده است).

لازم به ذکر است در بین سه پرایمر طراحی شده ،پرایمرهایی که تعداد ٤١٢ نوکلئوتید رااززنوم ویروس تکثیر میکنند حساس ترمیباشند .

در خصوص حساسیت ازمایشات انجام شده نیز باید یاد آور گردید این کارموقعی می تواند انجام شودکه این آزمایشات با یک روش Gold standard مانند کشت سلول مقایسه شود واگربا کیت های دیگر هم مقایسه شود حساسیت واقعی رانمی توان با آن مورد سنجش قرار داد.

روشهای مختلفی برای تشخیص بیماری لکه سفید مورد استفاده قرار گرفته است. روش شناسایی این بیماری با استفاده از علائم ظاهری اگرچه روشی سریع می‌باشد ولی تشخیص بیماری از روی علائم ظاهری بدلیل مشابهت آن با بیماریهای دیگر میگو از جمله بیماری Vibriosis و IHHNV و همچنین

افزایش pH آب مشکل است، زیرا کلیه بیماریهای اشاره شده دارای علائم ظاهری شبیه به هم می‌باشند و ایجاد پلاک سفید رنگ در روی بدن میگو می‌نمایند.

تشخیص این بیماری با استفاده از روش آسیب‌شناسی بافتی که توسط Lightner و Bell در سال ۱۹۸۸ و Lightner در سال ۱۹٦٦ ارائه گردیده است گرچه دقیق می‌باشد ولی با توجه به اینکه در این روش نیز بسیاری از علائم ایجاد شده با بعضی از بیماریهای دیگر میگو مثل بیماری IHHNV شبیه است، تشخیص قطعی مشکل می‌باشد. همچنین این روش با توجه به اینکه وقت زیادی نیاز دارد معمولاً نمی‌تواند بعنوان یک روش سریع در مزارع میگو مورد استفاده قرار گیرد.

مهمترین علائم ایجاد شده بیماری لکه سفید در روش آسیب‌شناسی بافتی ایجاد گنجیدگیهای Cowdry type- A می‌باشد (Thakahashi *et al*., 1994; wang *et al*.. 1999) که شبیه علائم ایجاد شده در بیماری IHHNV است (Bonameri & Lightner, 1991)

روش تشخیص با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روشی بسیار دقیق بوده که با استفاده از این روش میتوان عامل ایجاد کننده بیماری را شناسایی کرده و به تشخیص قطعی دست یافت(Hayat Lightner, 1966; 1986). این روش برغم دقت و اهمیتی که در تشخیص بیماریهای ویروسی از جمله بیماری لکه سفید دارد ولی هزینه زیادی نیاز دارد و تجهیزات پیچیده‌ای در این روش مورد استفاده قرار می‌گیرد و همچنین وقت زیادی برای تشخیص با این روش مورد نیاز است. بنابراین تنها به منظور تشخیص عامل بیماری و بررسی بیماریزایی در آزمایشگاه کاربرد دارد و نمی‌تواند در مزارع پرورشی میگو مورد استفاده قرار گیرد.

امروزه استفاده از روشهای مولکولی برای تشخیص بیماری میگو بطور وسیع کاربرد دارد. این روشها علاوه بر اینکه می‌تواند عامل بیماری را در بافتهای میگو مورد شناسایی قرار دهند، در تشخیص این عوامل در مواد غذایی مصرفی و همچنین در محیط پرورش نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. از خصوصیات ویژه

روشهای مولکولی سرعت و دقت است که به منظور پیشگیری از بیماری بسیار حائز اهمیت می‌باشد.در میان روشهای مولکولی، روش PCR با توجه به سرعت و دقتی که دارد از سایر روشهای مولکولی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است.

در این روش کمتر از ۱۰ مولکول DNA از عامل بیماری برای تشخیص کافی است در صورتیکه در دیگر روشهای مولکولی به بیشتر از ۱۰۰ مولکول نیاز است (Kou *et al*; 1998). با توجه به شدت مرگ و میرناشی از بیماری لکه سفید و با توجه به اینکه این بیماری غالباً در میگوها بصورت نهفته می‌باشد این موضوع حائز اهمیت بوده و با استفاده از این روش می‌توان عامل بیماری را در پایین‌ترین سطح نیز شناسایی نموده و از بروز بیماری جلوگیری کرد.

Kou و همکاران در سال ۱۹۹۸ با توجه به اهمیت بیماری و ایجاد نتیجه منفی کاذب پیشنهاد نمودند بهتر است برای شناسایی بیماری لکه سفید بجای استفاده از PCR یک مرحله‌ایی از روش PCR دو مرحله‌ایی یا Nested - PCR استفاده گردد. زیرا Nested – PCR حدود ۱۰۰۰ مرتبه حساسیت بیشتری از PCR یک مرحله‌ایی داشته و تعداد کپی ایجاد شده از DNA ۱۰ تا ۵۰ مرتبه بیشتر می‌باشد و به همین دلیل امکان ایجاد نمونه‌های منفی کاذب به حداقل می‌رسد. Lee در سال ۱۹۹۷ با توجه به اهمیت Nested – PCR توانستند کیت مخصوص بیماری لکه سفید را با این روش تولید نموده که هم اکنون به صورت تجارتی عرضه می‌گردد.

براساس مطالعات انجام گرفته عوامل متعددی در انتقال این بیماری نقش دارند که مهمترین آنها عبارتند از:

الف- مولدین (وحشی و پرورشی)

ب – پست لاروهای تولیدی در سالنهای هچری

ج – موجوداتی که می توانند هم میزبان و هم ناقل ویروس بیماری باشند.

د- آب ورودی به مزارع پرورشی و سالنهای هچری

ر- کارگران و شاغلین مزارع پرورشی و سالنهای هچری

ز- غذا و داروهای مصرفی در مزارع پرورشی و سالنهای هچری

ص- باد و حشرات موجود در طبیعت

ض – مواد و آبزیان دریایی منجمد شده که در کارخانه های عمل آوری مجددا" بسته بندی می شوند (Wang *et al*.,1999).

همانگونه که مشاهده می شود عوامل متعددی می توانند یا به عنوان ناقل فیزیکی ویروس بیماری باشد و یا به عنوان ناقل فیزیکی و بیولوژیکی آن، بنابراین ملاحظه می شود که ویروس ایجاد کننده بیماری از دامنه وسیع از ناقلین و میزبان برخوردار است.

الف) استفاده از مولدین عاری از ویروس در جلوگیری از بروز بیماری بسیار مهم می باشد. معمولا" در مناطقی که بیماری لکه سفید بروز میکند سعی می کنند از مولدین پرورشی جهت پست لارو استفاده نمایند. استفاده از مولدین وحشی این خطر را دارد که ویروس عامل بیماری که در منطقه اپیدمی شده در این دسته از مولدین به کارگاههای هچری منتقل شده و علیرغم اینکه میگوهای مولد وحشی فاقد علائم ظاهری بیماری بوده و حتی ممکن است با آزمایش PCR نیز آلودگی را نشان ندهند، ولی وقتی در شرایط کارگاههای پرورشی قرار گیرند و استرس به آنها وارد شود احتمال شیوع بیماری لکه سفید افزایش می یابد.

ب)پست لاروهای تولیدی از مولدین می تواند یکی از عوامل جدی انتقال و توسعه بیماری لکه سفید باشد. با تمام مراقبتهایی که در تامین مولدین عاری از بیماری جهت تولید پست لارو صورت می گیرد، ولی عدم دقت و مراقبت لازم در تامین پست لاروهای کیفی ریسک توسعه بیماری را افزایش می دهد. بنابراین

لازم است ابتدا در طراحی هچریها دقت صورت گیرد تا ضمن داشتن امکانات و تجهیزات مورد نیاز بتوان پست لاروهای کیفی و مناسب را تولید کند.

ج) موجودات بسیاری در انتقال بیماری لکه سفید به عنوان ناقلین فیزیکی و یا بیولوژیکی نقش دارند. پاره ائی از این موجودات خود می توانند میزبان بیماری واقع شده و نسبت به بیماری حساس باشند. به عنوان مثال تاکنون ۳۰ گونه میگوی وحشی و پرورشی نسبت به این بیماری حساس و تلفات ناشی از بیماری لکه سفید در آنها گزارش گردیده است.

دامنه میزبانی بیماری سایر سخت پوستان دریایی و آب شیرین را نیز در برمیگیرد که از مهمترین آنها می توان به انواعی از گونه های خرچنگ های دریایی ، لابستر و خرچنگهای آب شیرین اشاره نمود. همچنین با توجه به اینکه برخی از حشرات نیز می توانند در انتقال بیماری نقش داشته باشند، لذا احتمال انتقال ویروس از طریق حشرات نیز بالا است.

بنابراین با توجه به گسترده گی دامنه میزبانی ویروس بالاخص در خرچگها که علائم بالینی بیماری را نیز از خود نشان نمی دهند و به وفور در کنار استخرهای پرورشی یافت می شوند ریشه کنی بیماری را با سختی مواجه کرده است .(;Kou *et al*.,2002; Supamattaya, *et al*,1998).با توجه به اینکه در تولید مولدین پرورشی و همچنین در زمان نگهداری مولدین در هچریها از غذای تازه بالاخص خرچنگها، لابستر و ماهی مرکب برای تغذیه استفاده می شود و این موجودات صرفنظر از اهمیتی که در تغذیه مولدین دارند یکی از مخازن اصلی ویروس های پاتوژن بالاخص لکه سفید می باشند، لازم است قبل از مصرف این مواد به عنوان غذا در تغذیه مولدین با درجه حرارت استرلیزه یا پاستوریزه به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده تا ویروسهای پاتوژن در آنها غیر فعال شده و سپس از آنها در تغذیه مولدین استفاده نمود(Wang *et al*.,1999;FAO,2003).

د) ویروس بیماری لکه سفید قادر است به مدت 5 تا 7 روز در آب زنده مانده و بیماریزایی خود را حفظ نماید. بنابراین یکی از راههای انتقال بیماری به سالنهای هچری و مزارع پرورشی آب ورودی به آنها است. آب ورودی علاوه بر اینکه می تواند حامل ویروس آزاد باشد ، می تواند ناقل تعدادی زیادی از ناقلین ویروس مثل پلانکتونها ، لارو آبزیان اعم از ماهی و میگو و سایر جانداران دیگر نیز باشد. بنابراین لازم است قبل از استفاده آب در مزارع و هچریها ضدعفونی شده و سپس استفاده گردد..

برای مزارع بزرگی که دارای شوری بالا بوده و نیازمند تعویض آب زیاد میباشند، نصب توری بهترین راه عملی جهت خارج کردن ناقلین ویروسWSD بوده و در کنار آن می توان از داروهای شیمیائی نیز استفاده نمود.

ر)کارگران و شاغلین مزارع پرورشی و سالنهای هچری می توانند عاملی جهت انتقال ویروس به مزارع و سالنها باشند ، همچنین بی دقتی در انجام وظایف محوله در محل کار می تواند موجب ایجاد استرس به میگوهای مولد یا پست لارو ها شده و زمینه بروز بیماری را فراهم نماید. بنابراین ضرورت دارد کلیه هچریها و مزارع پرورشی دارای برنامه عملیاتی استاندارد بنام Standard Operating Procedures (SOPs) بوده و در این برنامه کلیه عملیات اجرائی تا رسیدن به پست لارو در هچری یا تولید میگوی پرورشی در مزارع را تشریح نماید.

زمینه های پیشنهادی جهت تحقیقات آینده :

۱ – تهیه تیره های سلولی جهت کشت ویروس عامل بیماری

۲ – مقایسه ژنتیکی ویروس عامل بیماری در استانهای مختلف کشور جهت تعیین تفاوتهای احتمالی آنها

۳- بهبود کارائی و کیفیت روشهای تشخیصی موجود

٤- مطالعه دقیقتر روشهای خنثی سازی ویروس در محیط

٥- بررسی مجدد و دقیقتر ناقلین ویروس در محیط زندگی میگو

٦- مقایسه ساختار ژنتیکی ویروس ایران و جهان

تقدیر و تشکر :

از ریاست محترم موسسه تحقیقات شیلات ایران جناب آقای دکتر مطلبی و نیز رئیس محترم سابق موسسه تحقیقات شیلات ایران جناب آقای دکتر رضوانی ، جناب آقای دکتر افشار نسب ، جناب آقای دکتر شریف روحانی، جناب آقای دکتر غرقی و جناب آقای دکتر مهرابی که در حمایت از اجرای این تحقیق و هدایت آن نقش موثری داشته اند تقدیر و تشکر مینمائیم.

همچنین از کارشناسان محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی سرکار خانم غیور و سرکار خانم بنده پور که در انجام کلیه آزمایشات این تحقیق زحمات و تلاشهای فراوانی را متحمل شدند نهایت تشکر و سپاسگزاری را داریم.

شكل شماره ۸ : گواهي ثبت ژن VP24 در بانك ژن

NCBI Sequence Viewer v2.0

NCBI Nucleotide

My NCBI [Sign In] [Register]

PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy OMIM Books

Search Nucleotide for Go Clear

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display GenBank Show 5 Send to Hide: Sequence Lesser features

Range: from begin to end Reverse complemented strand Features: + Refresh

1: DQ196431. Reports Shrimp white spot...[gi:74484346] Links

Features Sequence

```
LOCUS       DQ196431                715 bp    DNA     linear   VRL 28-DEC-2005
DEFINITION  Shrimp white spot syndrome virus from Iran VP24 gene, complete cds.
ACCESSION   DQ196431
VERSION     DQ196431.1  GI:74484346
KEYWORDS    .
SOURCE      Shrimp white spot syndrome virus
  ORGANISM  Shrimp white spot syndrome virus
            Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Nimaviridae; Whispovirus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 715)
  AUTHORS   Kazemi,B. and Saberi,A.M.
  TITLE     Shrimp white spot syndrome virus isolate Iran VP24 gene
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 715)
  AUTHORS   Kazemi,B., Saberi,A.M. and Afsharnasab,M.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-SEP-2005) Cellular and Molecular Biology Research,
            Agricultural Research & Education Organization, and Iranian
            Fisheries Research Institute, Shaheed Beheshti University of
            Medical Sciences, Ministry of Jihad-e-Agricultural, Chamran High
            Way, Tehran 19395, Iran
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..715
                     /organism="Shrimp white spot syndrome virus"
                     /virion
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:92652"
                     /country="Iran"
     CDS             8..634
                     /codon_start=1
                     /product="VP24"
                     /protein_id="ABA10826.1"
                     /db_xref="GI:74484347"
```

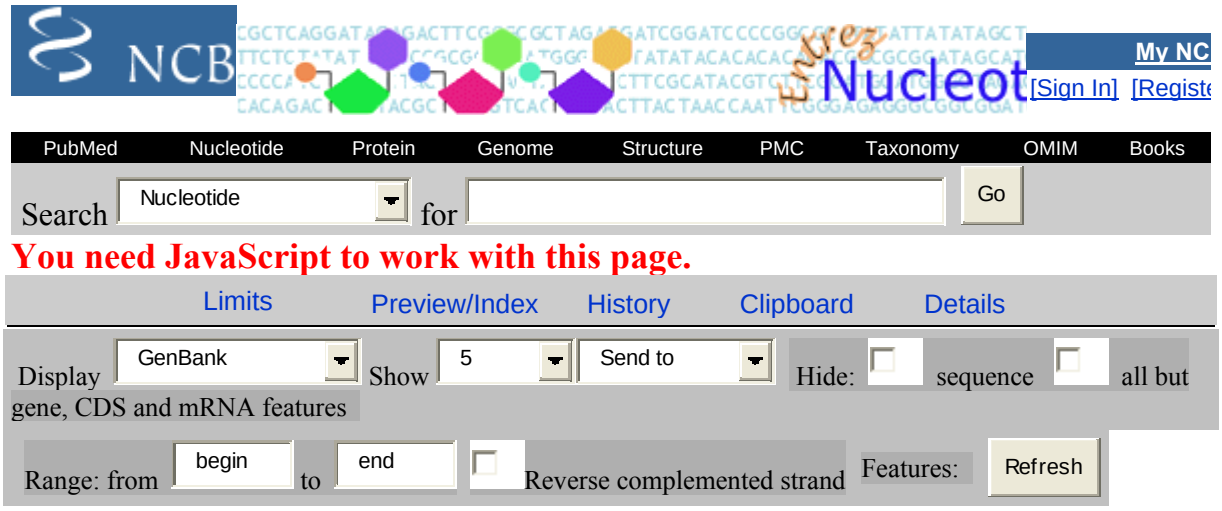
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=74484346 (1 of 2)2006/12/23 06:40:03 • •

NCBI Sequence Viewer v2.0

```
                     /translation="MHMGGVNAAILAGLTLILVVISIVVTNIVLNQKLDQXDKDAYPD
                     ESDIIXLTINGAARVHHFNFVYGTLQTRNYGKVYVAGQGTSDSELVKKKGDIILTSLL
                     GDGDHTLNVNKAESKELELYARVYNNTKRDITVDSVSLSPGLNATGREFSANKFVLYF
                     KPTVLKKNRINTLVFGATFDEDIDDTNRHYLLSMRFSPGNDLFKVGEK"
ORIGIN
        1 tttcaatatg cacatggggg gggttaacgc cgctatactg gcaggtttga cattgatact
       61 cgtggtaata tctatagttg taaccaacat agtacttaac cagaaattgg accagganga
      121 taaagacgcc taccctgatg aatcagacat aatanacttg accattaacg gtgctgctag
      181 agtacaccac tttaactttg tatacggcac attacaaacc aggaactatg gaaaggtata
      241 tgtagctggc caaggaacgt ccgattctga actggtaaaa aagaaaggag acataatcct
      301 cacatcttta cttggagacg gagaccacac actaaatgta aacaaagccg aatctaaaga
      361 attagaattg tatgcaagag tatacaataa tacaaagagg gatataacag tggactctgt
      421 ttcactgtct ccaggtctaa atgctacagg aagggaattt tcagctaaca aatttgtatt
      481 atatttcaaa ccaacagttt tgaagaaaaa taggatcaac acacttgtgt ttggagcaac
      541 gtttgacgaa gacatcgatg atacaaatag gcattatctg ttaagtatgc gattttctcc
      601 tggcaatgat ctgtttaagg ttggggaaaa ataaacacat tttttaaaaa tataccttta
      661 ttttattaac caattattta cattgtagct tgacattcac tactactata ccttt
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

شکل شماره ۹ : گواهي ثبت ژن WSV406



1: EF197113. Reports Shrimp white spot...[gi:124127027] Links

- Features
- Sequence

```
LOCUS       EF197113                757 bp    DNA     linear   VRL 30-
JAN-2007
DEFINITION  Shrimp white spot syndrome virus FIC protein (wsv406) gene,
partial
            cds.
ACCESSION   EF197113
VERSION     EF197113.1  GI:124127027
KEYWORDS    .
SOURCE      Shrimp white spot syndrome virus
  ORGANISM  Shrimp white spot syndrome virus
            Viruses; dsDNA viruses, no RNA stage; Nimaviridae;
Whispovirus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 757)
  AUTHORS   Kazemi,B., Saberi,A.M., Afsharnasab,M. and Ghayour,E.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (22-DEC-2006) Agricultural Research & Education
            Organization, and Iranian Fisheries Research Institute,
Shaheed
            Beheshti University of Medical Sciences, Ministry of
            Jihad-e-Agricultural, Chamran Highway, Tehran 19395, Iran
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..757
                     /organism="Shrimp white spot syndrome virus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:92652"
                     /country="Iran"
     gene            <1..>757
                     /gene="wsv406"
     CDS             <1..749
                     /gene="wsv406"
                     /codon_start=3
```

```
                     /product="FIC protein"
                     /protein_id="ABM92267.1"
                     /db_xref="GI:124127028"

/translation="GEGDWTTTFPFDLVHTRQECEKKREQDYSFFITETCKGENIGIH

SYEHTSKIIDTGNNDSTSIEELEVLNIYKAINHLENILKLNKGEKIILMDVETMILET

HKILMKGILPKGKNGSFSTCVRFAVNKNNERHYYPVFETEKEAFNSIQNLVDYYNEIV

AHTNDQIKIIKACAYFMYNFLTLHPFNDGNGRTARLLYSFLLKGNGIVPHFSPITHPR
                     DQFVDTLVYFREHGDGRPLLYVLLESIKNK"
ORIGIN
        1 agggggaagg agattggaca acaactttcc cattcgacct cgtccataca
cgtcaagagt
       61 gtgaaaaaaa gagagagcaa gactactcat ttttcattac tgaaacgtgt
aaaggagaga
      121 atattggtat acattcgtat gaacacacgt caaagattat tgacacgggt
aataatgatt
      181 ctacctcaat agaggaacta gaagtactga atatatacaa agctataaac
catttagaaa
      241 atatcctaaa actcaacaaa ggagaaaaaa ttatactgat ggatgtagaa
acaatgatac
      301 tggaaactca taaaatttta atgaaaggga ttcttcccaa gggtaaaaat
ggaagtttca
      361 gtacatgcgt acgctttgct gtaaataaga acaatgaacg gcattactac
cctgtatttg
      421 aaacagagaa agaagcgttc aattctatac aaaatctagt agattattat
aatgaaattg
      481 tagctcacac caatgaccaa attaaaataa taaaagcgtg cgcatatttc
atgtacaact
      541 ttctaactct ccacccttcc aatgatggta atggaagaac agctagatta
ttgtatagtt
      601 ttctattgaa aggtaatggt atcgtacctc atttttcacc cataacacac
cctagggatc
      661 aatttgttga tactttagtg tattttagag aacatggaga tggacgacct
ttattgtatg
      721 ttttgctgga atcaataaaa aataagtaaa gaattca
//
```

Disclaimer | Write to the Help Desk
NCBI | NLM | NIH

Apr 17 2007 11:10:07

منابع :

۱- محمد افشار نسب, سهراب رضوانی و فرامرز لالویی (۱۳۸۴). شناسایی بیماری لکه سفید (WSSD) با روش PCR در میگوی سفید هندی در ایران. مجله علمی شیلات ایران (فارسی), ۱۴ (۱): ۱۲-۱.

۲- محمد افشار نسب – بهروز تمجيدي – علايم كلينيكي و هيستوپاتولوژي بيماري لكه سفيد (WSVD) در ميگوي پرورشي سفيد هندي (Penaeus indicus) مجله علمی شیلات ایران (فارسی), سال دوازدهم ، شماره ۲،تایستان ۱۳۸۲، صفحات ۱۵ تا ۱۸

3- Bui Thi Minh Dieu, Hendrik Marks, J. Joukje Siebenga, Rob W. Goldbach, Douwe Zuidema, Tran Phuoc Duong and Just M. Vlak (2004*). Molecular epidemiology of white spot syndrome virus within Vietnam. J Gen Virol; 85: 3607-3618.*

4- Chang, P.S.C.F. Lo.Y.C.Wang and G.H.kou. 1996. *Identification of white target organs in the shrimp, spot syndrome associated baculovirus (WSBV) penaeus monodon by in situ hybridization. Aquaculture 164: 233_ 242.*

5 - Chang.P.S.H.C.Chen and Y.C.wang. 1998a. *Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentation infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridization. Aquaculture 164 : 233 _ 242*

6 - Chou, H.y. ; Huang, CH. ; Chang, H.C. and Lo, C,F. , 1995. *Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. Dis. Aquat.Org. Vol. 23, pp.165-173*

7 - Flegel, T.W. ; Boonyaratplain, S. And Withachumnamkul, B. , 1996. *Current status of research on yellow- head virus and white- spot virus in Thiland. In: LeRoy Creaawell R(ed) Book of abstracts. World Aquaculture 96 held in Bangkok, Thiland, and Jen 26-Feb2, 1996. World Aquaculture Society. Harbor Branch Oceanographic Institute, Ft pierce, FL,pp.125- 127.*

8 - Kou, G.H. ; Peng, S.E. ; Chin, Y.L. and LO, C.F. , 1998.*Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSD) in shrimp and crabs. In Flegel TW(ed) Advance in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotecnology, Bangkok*

9 - Lee,K.L. , 1997. *Development of automated nested PCR in the detection of white spot disease associated baculovirus (WSBV) using rapid cycle DNA amplification. Thesis of DVM, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of putra Malaysia, Serdang Selangor, Malaysia*

10 - Lightner, D.V. , 1996. A. *handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society.*

11 -. Marks h, Goldbach RW, Valk JM, Van Hulten MC (2004). *Genetic variation among isolates of White spot syndrome virus. . Arch Virol; 149(4):673-97.*

12 - Takahashi, Y. ;Itami, T. ; Kondo, M. ; Maeda, M. ; Fujii, R. ; Tomonaga, S. ; Supamattya, K. and Boonyaratpalin, S., 1994. *Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp (penaeus japonicus). Fish pathol. Vol.29, No.2, pp.121-125*

13 - Takahashi, Y. ; Itami, T. ; Kondo, M. ; Maeda, M. ; Supamattya, K. ; Boonyaratpalin, S. ; Suzuki, N. ; Kasornchandra, J. ; Khongpradit, R. ; Kawai, K. ; Kusuda, R. ; Hirono, I. and Aoki, T. , 1996. *Polymerase chain reaction(PCR) amplification of bacilliform and mesodermal baculovirus(SEMBV) DVA in Penaeus monodon Fabricus. J. Fish. Dis. 19:pp.399- 403*

14 - Van Hulten, M.C.W. ; Tsai, M.C.W. ; Tsai, M.F. ; Schipper, C.A. ; Lo, C.F.C. ; Kou, G.H. and Valk, J.M. , 2000. *Analaysis of a genomic segment of white spot syndrome virus of shrimp containing ribonucleotide reductase and repeat regions. Journal of Virol. Vol. 81, pp.307-316*

15 - Wongteerasupaya C, Pungchai P, Withyachumnarkul B, Boonsaeng V, panyim S, Flegel TW and Walker PJ (2003). *High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. . Dis Aquat Organ; 54(3):253-7.*

16 -.Wang Q, Numan LM, Lightner DV (2000). *Identification of genomic variations among geographic isolates of white spot syndrome virus using restriction analysis and Southern blot hybridization. Dis Auat Organ ; 43(3):175-81.*

17 - Wang, C.H. ; Lo, C.H. ; Leu, J.H. ; Chou, C.M. ; Yeh, P.Y. ; H.Y. ; Tung, M.C. ; Chang, C.F. ; Su, M.S. and Kou, G.H. , 1995. *purification and genomic analysis of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) OF Penaeus monodon. Dis Aquat. Org. Vol.23, PP239- 242.*

18 - Wang, Y.G. ; Tan. O.L. ; Lee, ; K.L. ; Hassan, M.D. and Shariff, M. 1990. *Health management of shrimp during growout . INFOFISH International 4/99:30- 36*

19 - Wang, Y.G. ; Lee, K.L. ; Najiah, M. ; Shriff, M. ; and Hassan. M.D. , 2000. *A new baculovirus white spot syndrome (BWSS) In cultured tiger shrimp penaeus monodon and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. Aquat. Org. Vol. 41, pp.9-18*

20- Xie X, Yang F (2006). *White spot syndrome virus VP24 interacts with VP28 and is involved in virus infection. J. Gen Virol ; 87(Pt 7):1903-*

MINISTRY OF JAHAD – E- AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH & EDUCATION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH INSTITUTE
FISH DISEASE DEPARTMENT

RESEARCH TITLE: Identification of white spot syndrom virus in cultured Penaeus indicus by polymerase Chain reaction (PCR) in I. R. IRAN

RESEARCH NO: 82-0710136000-11

RESEARCHER : A.M.Saberi – B.Kazemi

COWORKERS : M.Afsharnasab – M.bandehpoor – E.Ghayoor

ADVISERS:

LOCATION: Tehran

START DATE: 2004

DURATION: 2.5 years

PUBLISHER: Iranian Fisheries Research Institute

DATE OF ISSUE:2007

MINISTRY OF JAHAD-E-AGRICULTURE

AGRICULTURAL RESEARCH & EDUCATION ORGANIZATION

IRANIAN FISHERIES RESEARCH INSTITUTE

FINAL REPORT OF RESEARCH

Identification of white spot syndrom virus in cultured Penaeus indicus by polymerase Chain reaction (PCR) in I. R. IRAN

A.M.Saberi – B.Kazemi

REGISTER NO.