تشخیص، بررسی فیلوژنی و کلونینگ ژن G گلیکوپروتئین ویروس سپتی‌سمی هموراژیک (VHSV) جدا شده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*)

- **امیرعلی حیدری**: گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- **مصطفی اخلاق**: گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- **علی محمدی***: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
- **لاله معظمی‌گودرزی**: گروه تشخیص بیماری‌های آبزیان، مرکز ملی تشخیص، آزمایشگاه‌های مرجع و مطالعات کاربردی، سازمان دامپزشکی کشور، تهران، ایران
- **آزاده یکتاسرشت**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۸

چکیده

بیماری سپتی‌سمی خونریزی دهنده ازمهم‌ترین بیماری‌های ویروس آزادماهیان می‌باشد. ژنوم این ویروس شامل شش ژن می‌باشد که مهم‌ترین آن ژن G (گلیکوپروتئین) است و در ایمنی‌زایی علیه این ویروس نقش دارد. هدف از این مطالعه شناسایی ویروس سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده قزل‌آلای رنگین‌کمان، مطالعه فیلوژنی و کلونینگ ژن G ویروس در وکتور pTZ57r/t بود. پس از تشخیص ویروس سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده به‌روش RT-PCR وکلونیگ ژن G داخل پلاسمید pTZ57r/t، پلاسمید نوترکیب سنتزشده به باکتری پذیرا (*E. coli*) منتقل گردید. از کلونی‌های سفید دربردارنده وکتورنوترکیب جهت استخراج پلاسمید استفاده شد. اندازه ژن G ویروس سپتی‌سمی هموراژیک ۱۵۲۳ bp می‌باشد که در این پژوهش جهت تایید کلونینگ از روش کلونی PCR و تعیین توالی اسفاده شد. بررسی‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که ژن G با موفقیت در وکتور pTZ57r/t کلون گردیده است و می‌توان ازآن جهت بیان گلیکوپروتئین ویروس در وکتورهای بیانی به‌منظور تولید پروتئین استفاده کرد. نتایج حاصل شده از تعیین توالی ژن G نیز نشان داد که ویروس شناسایی شده در این مطالعه متعلق به ژنوتیپ Ia-2 بوده است. مطالعه حاضر نخستین تحقیقی است که در کشور به‌منظورکلونینگ ژن G ویروس سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده در وکتورهای پلاسمیدی انجام شده است.

کلمات کلیدی: ویروس VHS، G گلیکوپروتئین، قزل‌آلای رنگین‌کمان، کلونینگ

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mohammad@shirazu.ac.ir

مقدمه

بیماری سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده ویروسی (VHS) ازجمله بیماری‌های لیست OIE می‌باشد که عامل آن در خانواده رابدوویریده قرار دارد که با نام ویروس اگتوود نیز شناخته می شود و برای نخستین بار با علائمی شامل تورم کلیه و دژنراسیون کبدی توسط Schaeperclause و همکاران (۱۹۳۸) در دانمارک از مزارع قزل‌آلا رنگین کمان گزارش گردید. پس از آن مواردی از بروز این بیماری در هلند، فرانسه (Bellet، ۱۹۶۵؛ Besse، ۱۹۵۵)، ایتالیا (Ghittino، ۱۹۶۵) و هم‌چنین تلفات شدیدی در برخی جمعیت‌های وحشی مانند ساردین و هرینگ در سواحل آمریکا مشاهده شد (Schlotfeldt و همکاران، ۱۹۹۱؛ Hawley و Garver، ۲۰۰۸؛ Garver و همکاران، ۲۰۱۱؛ Kim و همکاران، ۲۰۰۹). ویروس VHS تمایل شدیدی به سلول‌های آندوتلیال دارد و منجر به خونریزی گسترده در سطح بدن می شود. این ضایعات به‌همراه خونریزی شدید در چشم، پوست، ماهیچه و اندام‌های داخلی دیده می‌شود (Brudeseth و همکاران، ۲۰۰۵). انتقال ویروس از طریق افقی و تماس با دیگر ماهیان آلوده یا آب آلوده می‌باشد. راه ورود ویروس به بدن ماهی احتمالاً از طریق آبشش یا پوست است (Skall و همکاران، ۲۰۰۵). کیفیت پایین آب، تراکم بالا، غذادهی زیاد بر دوره بیماری و شدت بیماری تاثیر دارند. از گونه‌های حساس به این ویروس می‌توان به راسته سالمونی‌فرمیس (Salmoniformes) (سالمون و قزل‌آلا) و کفشک ماهی و ماهی فلاندر ژاپنی اشاره کرد (Kim و همکاران، ۲۰۰۹؛ Vinay و همکاران، ۲۰۱۳). این ویروس دارای ۴ ژنوتیپ می‌باشد. ژنوم این ویروس به شکل یک RNA تک رشته‌ای به طول ۱۱kb می‌باشد که از شش ژن (-N-P-5'-M-G-NV-L-3') تشکیل شده است (Vinay و همکاران، ۲۰۱۳). مهم‌ترین ژن ویروس، ژن G می‌باشد که آنتی‌ژن سطحی را کد می‌کند و به‌عنوان ژن هدف برای تهیه واکسن و آنالیزهای فیلوژنی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Einer-Jensen و همکاران، ۲۰۰۵؛ Thompson و همکاران، ۲۰۱۱). این ژن هم‌چنین در تکثیر ویروس اهمیت زیادی داشته و در اتصال اولیه ویروس به سلول نقش دارد که پس از اتصال، ویروس‌وارد‌سلول‌میزبان‌شده‌و تکثیر می‌کند (Assenberg و همکاران، ۲۰۱۰؛ Purcell و همکاران، ۲۰۱۲).با توجه به برخی از مطالعات انجام شده، G گلیکوپروتئین ویروس سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده می‌تواند در ایمنی‌زایی ماهی علیه این ویروس نقش داشته باشد (Lecocq-Xhonneux و همکاران، ۱۹۹۴؛ Chico و همکاران، ۲۰۰۸). لذا هدف از این مطاله شناسایی مولکولی ویروس و تعیین فیلوژنی آن و سپس کلون کردن ژن G در وکتور pTZ57r/t بوده است. مطالعه حاضر نخستین تحقیقی است که در کشور به‌منظورکلونینگ ژن G ویروس سپتی‌سمی خونریزی دهنده در وکتورهای پلاسمیدی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: تعداد ۱۰ قطعه‌ماهی‌قزل‌آلای رنگین‌کمان مشکوک به آلودگی‌ویروسی با میانگین‌وزنی ۲±۷۰گرم،ازیکی از مزارع پرورش ماهی استان چهارمحال بختیاری، خریداری شد سپس در مجاورت یخ به بخش آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز منتقل شدند. نمونه‌گیری‌ازکلیه‌قدامی،طحال و قلب ماهیان انجام‌شد.نمونه‌های اخذ شده تا زمان انجام آزمایشات مولکولی‌در‌دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری‌شدند(Ahmadivand و همکاران، ۲۰۱۶).

استخراج RNAویروس‌و ساخت cDNA: ابتدا ترکیب هموژنی از بافت‌های کلیه قدامی، طحال و مغز ماهی ساخته شد. استخراج RNA بر روی ۵۰ میلی‌گرم از بافت‌های هموزن شده براساس دستورالعمل کیت استخراج RNA شرکت BIO Basic کانادا انجام شد.سپس،RNA استخراج‌شده‌در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. خلوص RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (Thermo scientific Nanodrop) اندازه‌گیری شد. سنتز cDNA برای هر نمونه در حجم کل ۲۰ میکرولیتر از ۴ میکرولیتر RNA با استفاده از پرایمر forward اختصاصی‌مربوط به ژن G گلیکوپروتئین ویروس‌سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده‌طبق دستورالعمل‌کیت سنتز cDNA مربوط به شرکت TAKARA ژاپن انجام شد.

آزمایش RT-PCR: به‌منظور شناسایی‌و تشخیص ژن G ویروس سپتی‌سمی‌خونریزی‌دهنده‌پرایمرهاباستفاده‌ازبرنامه Primer3طراحی گردید و پس از بررسی با برنامه oligo analyzer در بانک اطلاعاتی، blastشدند.توالی‌پرایمرفوروارد ۵'-ATGGAATGGAACACTTT-۳' و توالی پرایمر ریورس ۵'- GACCATCTGACTTCTG -۳' می‌باشد. جهت انجام PCR به‌منظور تکثیر ژن G، ۳ میکرولیتر از cDNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر کدام پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول، ۵ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس قرمز با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار منیزیم استفاده گردید. برنامه دستگاه ترموسایکلر با مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۶ درجه به‌مدت ۵ دقیقه و با انجام ۳۵ چرخه ۹۶ درجه به‌مدت ۴۰ ثانیه، ۵۸/۷ درجه به‌مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه به‌مدت یک دقیقه و با مرحله گسترش نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به پایان رسید. در نهایت محصول PCR روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفروز شد (شکل ۱). سپس محصول PCR مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل Bio Basic کانادا خالص سازی شد و برای تعیین توالی ارسال گردید. پس از دریافت نتایج

حاصل از تعیین توالی، ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از توالی‌های کامل ژن G به طول تقریبی ۱۵۲۳ جفت باز با نرم‌افزار Mega 6 و به روش Maximum likelihood و با آزمون Bootstrap با تکرار هزار بار صورت گرفت (شکل ۲).

کلونینگ ژن و استخراج پلاسمید: پس از خالص‌سازی محصول PCR مربوط به ژن G، واکنش اتصال طبق دستورالعمل کیت TA Cloning شرکت Thermo scientific fisher انجام شد و ژن G در وکتور pTZ57r/t کلون شد. با توجه به دستورالعمل کیت میزان ۳ میکرولیتر از پلاسمید pTZ57r/t، ۶ میکرولیتر از X Ligation ۵ Buffer، ۲ میکرولیتر از محصول خالص شده PCR، ۱ میکرولیتر آنزیم T4 DNA Ligase با هم مخلوط شده و آب دوبار تقطیر استریل به حجم ۳۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس میکروتیوب حاوی مخلوط واکنش ۱۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. پس از گذشت این مدت زمان، به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم، مخلوط واکنش به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحه بعد پلاسمید نوترکیب سنتز شده، به‌روش شیمیایی به سلول میزبان (باکتری *E.coli* سویه DH5α) منتقل شد (Li و همکاران، ۲۰۱۰). باکتری‌های حاوی پلاسمید روی محیط جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، X-gal و IPTG کشت داده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از رشد باکتری‌ها در محیط کشت که در واقع نشان دهنده وجود پلاسمید در داخل باکتری می‌باشد، انتخاب کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب که واجد ژن G می‌باشند براساس تشکیل کلونی‌های آبی و سفید صورت گرفت. کلونی‌های آبی رنگ فاقد پلاسمید نوترکیب هستند زیرا آنزیم بتاگالاکتوزیداز (LacZ) تولیدی X-gal را به محصول آبی هیدرولیز می‌کند. کلونی‌های سفید حاوی پلاسمید نوترکیب واجد ژن G می‌باشند زیرا با ورود قطعه DNA به جایگاه کلونینگ، توالی کد کننده آنزیم بتاگالاکتوزیداز مختل شده و باکتری دیگر قادر به تولید این آنزیم نمی‌باشد و در نتیجه X-gal تجزیه نخواد شد و کلونی‌ها به رنگ سفید نشان داده می‌شوند (Sambrook و Russell، ۲۰۰۱)(شکل ۳).

بررسی کلونینگ ژن G

غربال‌گری با کلونی PCR: پس از مشاهده کلونی‌های آبی و سفید بر روی پلیت های کشت باکتری، بین ۵ تا ۱۰ عدد کلونی سفید انتخاب شد و به‌صورت خطی در پلیت جدید حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG کشت داده و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌نگه‌داری شد. مقداری از کلونی با استفاده از سر سمپلر استریل برداشته و به‌عنوان الگو در واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن G استفاده شد. نتایج کلونی PCR با الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

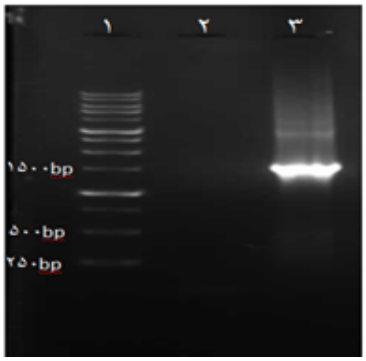
تعیین توالی پلاسمیدهای نوترکیب: مقدار ۳۰ میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب برای تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال شد. تعیین توالی با استفاده از پرایمرهای عمومی رفت و برگشت M13 Forward و M13 Reverse که توالی نوکلئوتیدی آن‌ها در پلاسمید pTZ57r/t وجود داشت، به‌صورت دوطرفه انجام شد. پس از دریافت نتایج تعیین توالی پلاسمید نوترکیب pTZ57r/t -G glycoprotein، با استفاده از نرم‌افزار بیوانفورماتیک blast موجود در پایگاه اینترنتی NCBI، توالی محصول PCR مربوط به ژن G ویروس سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده‌ازنظروجود تشابه و اختلافات با توالی‌های نوکلئوتیدی دیگر مربوط به ژن G مقایسه شدند. به‌منظور ترسیم درخت فیلوژنی و تعیین نوع ژنوتیپ ویروس شناسایی شده با کد دسترسی ثبت شده در بانک ژن (MH794504)، از توالی‌های مطالعات پیشین استفاده شد (Kahns و همکاران، ۲۰۱۲؛ Einer-Jensen و همکاران، ۲۰۰۴؛ Nishizawa و همکاران، ۲۰۰۶) استفاده شد.

نتایج

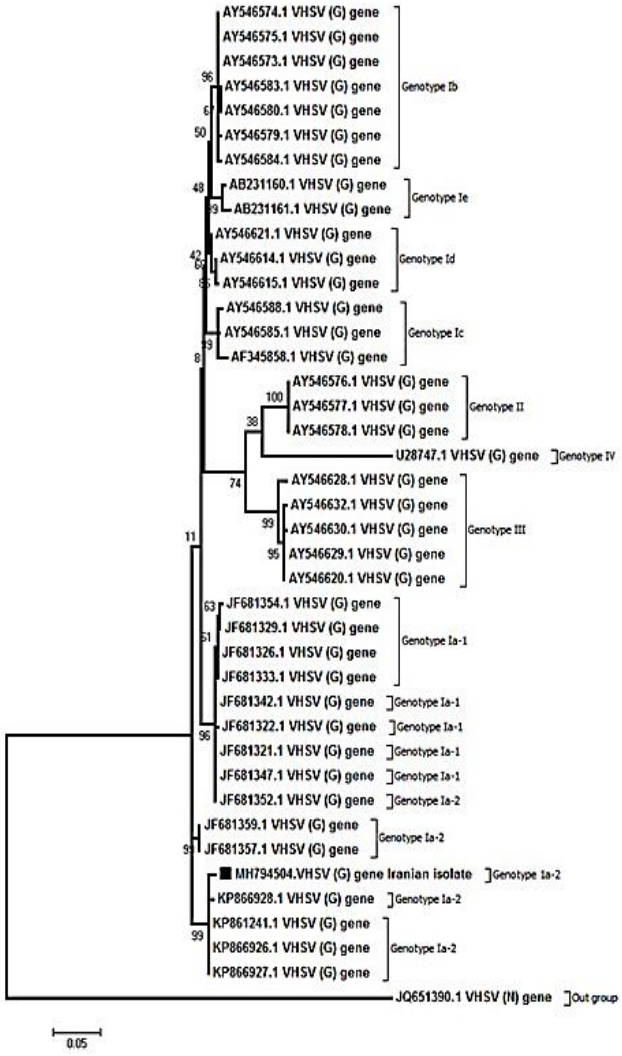
شناسایی و فیلوژنی ژن G: شناسایی و تکثیر ژن G ویروس VHS با روش PCR منجر به تکثیر قطعه اختصاصی شد که به شکل باندی در اندازه ۱۵۲۳bp در ژل آگاروز یک درصد ظاهر گردید (شکل ۱). به‌منظور تایید نهایی قطعه مورد نظر، تعیین توالی توسط شرکت ژن فناوران انجام شد و توالی ژن مورد مطالعه با شماره دسترسی MH794504 و با مشابهت ۱۰۰-۹۹ درصد با سایر توالی‌های مربوط به ژن G در بانک ژن ثپت گردید. درخت فیلوژنی ترسیم شده حاصل از توالی‌های کامل ژن G نشان داد که ایزوله جدا شده در این مطالعه به‌همراه دیگر ایزوله‌های ایرانی ثبت شده در بانک ژن با شماره‌های دسترسی KP866928، KP861241، KP866926 و KP866927 در گروه ژنوتیپ Ia-2 قرار گرفتند. در این بررسی توالی ژن N ویروس VHS به‌عنوان توالی خارج گروهی درنظر گرفته شد (شکل ۲). نوع ژنوتیپ به‌دست آمده با توجه به نتایج حاصل از ترسیم درخت فیلوژنی که در شکل ۱ نشان داده شده است، Ia-2 درنظر گرفته شد (شکل ۲).

کلونینگ ژن G: همان‌طورکه ذکرشدبررسی اولیه کلونینگ ژن G ویروس VHS با مشاهده کلونی‌های آبی و سفید بر روی پلیت‌های کشت باکتری انجام شد. بر این اساس با توجه توضیحات داده شده، کلونی‌های سفید رنگ به‌عنوان باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب درنظر گرفته شدند (شکل ۳). در ادامه بر روی کلونی‌های سفید رنگ، آزمایش کلونی PCR انجام گرفت. که نتایج مربوط به آن در شکل ۴

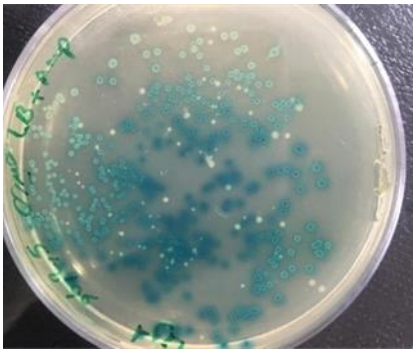
نشان داده شده است. نهایتاً به‌منظور تایید نهایی کلونینگ ژن G، پلاسمیدهای استخراج شده تعیین توالی شدند.



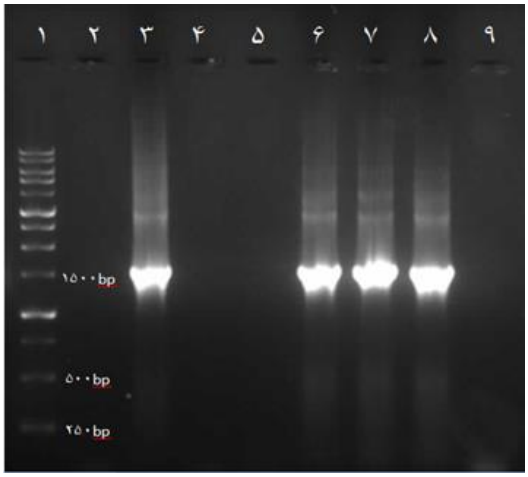
شکل ۱: نتیجه واکنش PCR مربوط به ژن G ویروس VHS: ۱- نردبان ژنی ۲-کنترل منفی ۳- نمونه مربوط به ژن G



شکل ۲: درخت فیلوژنی ترسیم شده براساس توالی کامل ژن G ویروس VHS



شکل ۳: تصویر مربوط به کلونی‌های سفید و آبی باکتری پذیرا (*E. coli*)



شکل ۴: نتایج کلونی PCR مربوط به کلونینگ ژن G در وکتور pTZ57r/t . ۱- نردبان ژنی ۲- شاهد منفی ۲- شاهد مثبت PCR ۴، ۵ و ۹- نتیجه PCR پلاسمیدهایی که فاقد ژن G هستند ۶، ۷ و ۸- نتیجه PCR پلاسمیدهایی که واجد ژن G هستند.

بحث

بیماری سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده (VHS) از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی است که به لحاظ تلفات رتبه نخست بیماریزایی را در بین سایر عوامل عفونی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد (Ahmadivand و همکاران، ۲۰۱۶). این ویروس به‌شدت صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را تحت تاثیر قرار داده و باعث خسارات سنگین اقتصادی شده است. بنابراین به‌عنوان یک تهدید برای توسعه این صنعت درنظر گرفته می‌شود. نخستین گزارش از بروز این بیماری در ایران مربوط به سال ۲۰۰۵ از گیلان بوده است و پس از آن بیماری به دیگر مناطق پرورش ماهی قزل‌آلا در کشور گسترش یافته است (Haghighi و همکاران، ۲۰۰۸؛ Ghorani و همکاران، ۲۰۱۶). در این مطالعه ضمن تشخیص مولکولی ویروس VHS، بررسی‌های فیلوژنی نشان داد که

جدایه مطالعه حاضر با کد دسترسی(MH794504) متعلق به ژنوتیپ Ia و زیر شاخه Ia-2 می‌باشد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن G ویروس VHS جدایه مطالعه حاضر با سایر مطالعات نشان داد که بیش‌ترین تشابه با ایزوله‌های ویروسی آلمان، فرانسه‌و لهستان بوده است (Kahns و همکاران، ۲۰۱۲). با توجه به تشابه ژنوتیپی که بین جدایه ایران و کشورهای‌اروپاییوجوددارد‌و این‌که میزبان تمامی جدایه‌های ویروسی کشورهای ذکر شده، قزل‌آلای رنگین‌کمان بوده است، به‌نظر می‌رسد منشاء ورود ویروس به ایران در اثر تجارت افراد با کشورهای اروپایی بوده است. کلونینگ ژن به معنای انتخاب و ازدیاد یک ژن به‌منظور حفظ قسمتی از یک مولکول DNA است که می‌تواند مصارف مختلفی داشته باشد. در این روش زیست‌شناسان مولکولی از توانایی تکثیر سلول‌های کشت‌شده برای تکثیر ژن‌ها بهره می‌گیرند (Casadaban و Cohen، ۱۹۸۰). به‌دلیل اهمیت ژن G ویروس VHS، کلونینگ و بیان این ژن در وکتورهای مختلفی نظیر وکتورهای پروکاریوتی، یوکاریوتی و ویروسی انجام شده است (Bearzotti و همکاران، ۱۹۹۵). در مطالعه حاضر، هدف شناسایی و کلون کردن ژن G ویروس به‌دست آمده از استان چهارمحال بختیاری در وکتور pTZ57r/t بوده است که می‌توان از آن به‌منظور انجام تحقیقاتی نظیر تولید G پروتئین، DNA واکسن و هم‌چنین استانداردلازم در تیتراسیون مولکولی ویروس استفاده کرد. همان‌طورکه ذکر شد ژنوم ویروس VHS، از شش ژن تشکیل شده است که مهم‌ترین آن‌ها ژن G می‌باشد. مطالعات نشان داده است که اپیتوپ‌هایی از ویروس VHS که دارای‌نقش‌ایمنی‌زایی هستند، همانند رابدوویروس عامل بیماری نکروز عفونی بافت خون‌ساز(IHN) بر روی سطح Gپروتئین‌ویروس واقع شده‌اند(Lecocq-Xhonneux‌و همکاران، ۱۹۹۴). پیش از این مطالعات مختلفی به‌منظور کلون کردن و بیان ژن G ویروس VHS به‌خصوص در باکتری *E. coli* انجام گردیده است (Lorenzen و همکاران، ۱۹۹۳). مطالعات دیگر نشان داد که تولید و خالص‌سازی پروتئین G تولید شده در سیستم‌های پروکاریوتی نظیر باکتری *E. coli* و تزریق پروتئین نوترکیب سنتز شده به ماهی، منجر به تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده در بدن ماهی می‌گردد (Lecocq-Xhonneux و همکاران، ۱۹۹۴). در تحقیق حاضر ژن G ویروس سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده شناسایی‌وکلونینگ cDNA آن با استفاده از وکتور pTZ57r/t در باکتری *E. coli* انجام شد. با استخراج پلاسمید نوترکیب و تعیین توالی محصول به‌دست آمده، کلونینگ ژن G، تایید شد و سپس توالی نوکلئوتیدی ژن G ویروس محلی با جدایه‌های سایر کشورها مقایسه شد. توالی کدکننده ژن G ویروس ۱۵۲۳ bp بوده که بیش‌ترین تشابه را همان‌طورکه پیش‌تر ذکر شد با جدایه‌های اروپا داشته است. کلونینگ و بیان ژن G ویروس VHS در حشرات و دیگر سلول‌های یوکاریوتی نیز انجام شده است (Acosta و همکاران، ۲۰۰۶). در مطالعه‌ای که کلونینگ ژن G به‌منظور تولید DNA واکسن برای VHSV انجام گرفت،نشان داده شد که حتی توالی پلاسمیدهایی که به این منظور استفاده شده‌اند، می‌تواند در بروز پاسخ ایمنی ماهی علیه VHSV تاثیرگذار باشد (Chico و همکاران، ۲۰۰۸). Acosta و همکاران (۲۰۰۶) نیز نشان دادند که کلونینگ و بیان ژن G در سطح سلول‌های یوکاریوتی نظیر سلول RTG-P1 می‌تواند منجر به القای تولید اینترفرون نوع یک در سلول‌های مجاور گردد (Acosta و همکاران، ۲۰۰۶). از دیگر اهمیت‌های ژن G ویروس این است که می‌توان از آن به‌عنوان یک ادجوانت مولکولی علیه دیگر بیماری‌های ویروسی‌استفاده‌کرد.درمطالعه Martinez-Lopez و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده شد که اجزای اصلی ژن G ویروس می‌تواند به‌عنوان یک ادجوانت مولکولی علیه بیماری ویرمی بهاره کپورماهیان (SVC) عمل کند. علاوه بر این در مواردی که از ژن G به‌عنوان DNA واکسن علیه بیماری سپتی‌سمی هموراژیک استفاده شده است، می‌توان از ادجوانت‌های مولکولی به‌منظور افزایش پاسخ ایمنی ماهی علیه G پروتئین استفاده کرد (Lazaret و همکاران، ۲۰۱۷). مطالعه حاضر نخستین تحقیقی در کشور است که ضمن تشخیص ویروس VHS، در زمینه کلونینگ ژن G ویروس در داخل وکتورهای پلاسمیدی انجام گرفته است.

منابع

۱. **Acosta, F.; Collet, B.; Lorenzen, N. and Ellis, A.E., 2006.** Expression of the glycoprotein of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) on the surface of the fish cell line RTG-P1 induces type 1 interferon expression in neighbouring cells. Fish & shellfish immunol. Vol. 21, No. 3, pp: 272-278.

۲. **Ahmadivand, S.; Soltani, M.; Mardani, K.; Shokrpoor, S.; Rahmati Holasoo, H.; Mokhtari, A. and Hasanzadeh, R., 2016.** Isolation and identification of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) in Iran. Acta tropica. Vol. 15, No. 6, pp: 30-36.

۳. **Assenberg, R.; Delmas, O.; Morin, B.; Graham, S.C.; De Lamballerie, X.; Laubert, C. and Brandt, B.W., 2010.** Genomics and structure/function studies of Rhabdoviridae proteins involved in replication and transcription. Antiviral Research. Vol. 87, No. 2, pp: 149-161.

۴. **Bearzotti, M.; Monnier, A. F.; Vende, P.; Grosclaude, J.; De Kinkelin, P. and Benmansour, A., 1995.** The glycoprotein of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV): antigenicity and role in virulence. Veterinary research. Vol. 26, No. 5, pp: 413-422.

۵. **Bellet, R., 1965.** Viral hemorrhagic septicemia (VHS) of the rainbow trout bred in France. Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 126, No. 1, pp: 461-467.

۶. **Besse, P., 1955.** Research on the etiology of infectious anemia of trout. Bulliten de l'Academie Veterinaire de France. Vol. 5, pp: 194-198.

۷. **Brudeseth, B.E.; Raynard, R.S.; King, J.A. and Evensen, Ø., 2005.** Sequential pathology after experimental infection

with marine viral hemorrhagic septicemia virus isolates of low and high virulence in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Veterinary Pathology Online. Vol. 42, No. 1, pp: 9-18.

۸. **Casadaban, M.J. and Cohen, S.N., 1980.** Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in Escherichia coli. J of molecular biology. Vol. 138, No. 2, pp: 179-207.

۹. **Chico, V.; Ortega Villaizan, M.; Falco, A.; Tafalla, C.; Perez, L.; Coll, J.M. and Estepa, A., 2009.** The immunogenicity of viral haemorragic septicaemia rhabdovirus (VHSV) DNA vaccines can depend on plasmid regulatory sequences. Vaccine. Vol. 27, No. 13, pp: 1938-1948.

۱۰. **Einer Jensen, K.; Ahrens, P. and Lorenzen, N., 2005.** Parallel phylogenetic analyses using the N, G or Nv gene from a fixed group of VHSV isolates reveal the same overall genetic typing. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 67, No. 2, pp: 39-45.

۱۱. **Garver, K.A.; Hawley, L.M.; McClure, C.A.; Schroeder, T.; Aldous, S.; Doig, F. and Richard, J., 2011.** Development and validation of a reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral hemorrhagic septicemia virus. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 95, No. 2, pp: 97-112

۱۲. **Ghittino, P., 1965.** Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout in Italy. Annals of the New York Academy of Sciences. Vol. 126, No. 1, pp: 468-478.

۱۳. **Ghorani, M.; Adel, M.; Dadar, M.; Ghalyanchi Langeroudi, A.; Kamyabi, R.; Vikram N.V. and Einer Jensen, K., 2016.** Phylogenetic analysis of the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus from Iranian trout farms points towards a common European origin. Veterinary Microbiology. Vol. 186, pp: 97-101.

۱۴. **Haghighi, K.H.A.; Bandehpour, M.; Sharifnia, Z. and Kazemi, B., 2008.** Diagnosis of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in Iranian rainbow trout aquaculture by pathology & molecular techniques. European Association of Fish Pathologists. Vol. 28, pp: 170-175.

۱۵. **Hawley, L.M. and Garver, K.A., 2008.** Stability of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in freshwater and seawater at various temperatures. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 82, No. 3, pp: 171-178.

۱۶. **Kahns, S.; Skall, H.F.; Kaas, R.S.; Korsholm, H.; Bang, J.B.; Jonstrup, S.P. and Olesen, N.J., 2012.** European freshwater VHSV genotype Ia isolates divide into two distinct subpopulations. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 99, pp: 23–35.

۱۷. **Kim, W.S.; Kim, S.R.; Kim, D.; Kim, J.O.; Park, M.A.; Kitamura, S.I. and Oh, M.J., 2009.** An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea. Aquaculture. Vol. 296, No. 1, pp: 165-168.

۱۸. **Lazarte, J.M.S.; Kim, Y.R.; Lee, J.S.; Im, S.P.; Kim, S.W.; Jung, J.W. and Jung, T.S., 2017.** Enhancement of glycoprotein-based DNA vaccine for viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) via addition of the molecular adjuvant, DDX41. Fish & shellfish immunology. Vol. 62, pp: 356-365.

۱۹. **Lecocq Xhonneux, F.; Thiry, M.; Dheur, I.; Rossius, M.; Vanderheijden, N.; Martial, J. and De Kinkelin, P., 1994.** A recombinant viral haemorrhagic septicaemia virus glycoprotein expressed in insect cells induces protective immunity in rainbow trout. Journal of General Virology. Vol. 75, No. 7, pp: 1579-1587.

۲۰. **Li, X.; Sui, X.; Zhang, Y.; Sun, Y.; Zhao, Y.; Zhai, Y. and Wang, Q., 2010.** An improved calcium chloride method preparation and transformation of competent cells. African Journal of Biotechnology. Vol. 9, No. 50, pp: 8549-8554.

۲۱. **Lorenzen, N.; Olesen, N.J.; Jørgensen, P.V.; Etzerodt, M.; Holtet, T.L. and Thøgersen, H.C., 1993.** Molecular cloning and expression in Escherichia coli of the glycoprotein gene of VHS virus, and immunization of rainbow trout with the recombinant protein. Journal of General Virology. Vol. 74, No. 4, pp: 623-630.

۲۲. **Martinez Lopez, A.; Garcia Valtanen, P.; Ortega Villaizan, M.; Chico, V.; Gomez Casado, E.; Coll, J.M. and Estepa, A., 2014.** VHSV G glycoprotein major determinants implicated in triggering the host type I IFN antiviral response as DNA vaccine molecular adjuvants. Vaccine. Vol. 32, No. 45, pp: 6012-6019.

۲۳. **Nishizawa, T.; Savaş, H.; Işıdan, H.; Üstündag, C.; Iwamoto, H. and Yoshimizu, M., 2006.** Genotyping and pathogenicity of viral hemorrhagic septicemia virus from free-living turbot (Psetta maxima) in a Turkish coastal area of the Black Sea. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 72, No. 4, pp: 2373-2378.

۲۴. **Purcell, M.K.; Laing, K.J. and Winton, J.R., 2012.** Immunity to fish rhabdoviruses. Viruses. Vol. 4, No. 1, pp: 140-166.

۲۵. **Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd eds. Cold Spring Harbor Laborator Press. ISBN.978-087969577-4, New York. 2344 p.

۲۶. **Schaeperclause, W., 1938.** Damage to the German fisheries by fish parasites and fishdiseases. Allgemeine Fischerei Zeitung. Vol. 41, pp: :256-259.

۲۷. **Schlotfeldt, H.J.; Ahne, W.; Vestergard Jorgensen, P.E. and Glende, W., 1991.** Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) a natural outbreak. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom).

۲۸. **Skall, H.F.; Olesen, N.J. and Mellergaard, S., 2005.** Prevalence of viral haemorrhagic septicaemia virus in Danish marine fishes and its occurrence in new host species. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 66, No. 2, pp: 145-151.

۲۹. **Thompson, T.M.; Batts, W.N.; Faisal, M.; Bowser, P.; Casey, J.W.; Phillips, K. and Kurath, G., 2011.** Emergence of Viral hemorrhagic septicemia virus in the North American Great Lakes region is associated with low viral genetic diversity. Diseases of Aquatic Organisms. Vol. 96, No. 1, pp: 29-43.

۳۰. **Vinay, T.N.; Kim, Y.J.; Jung, M.H.; Kim, W.S.; Kim, D.H. and Jung, S.J., 2013.** Inactivated vaccine against viral hemorrhagic septicemia (VHS) emulsified with squalene and aluminum hydroxide adjuvant provides long term protection in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Vaccine. Vol. 31, No. 41, pp: 4603-4610.