

## سکانس کامل سویه IR Clone12 مشتق شده از سویه لاسوتا ویروس نیوکاسل مؤسسه رازی به روش کلونینگ

• ایوب سلیمی (نویسنده مسئول)

مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران  
• آیدین ملوکی

مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران  
• حسین گودرزی

مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران  
• سید رضا ابراهیمی

مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران  
• محمد مجید ابراهیمی

مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران  
• بهمن خالصی

مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران



تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۷-۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۶-۲۵

Email: ayuobsalimi@yahoo.com

### چکیده

در چند سال اخیر بیماری نیوکاسل در صنعت طیور خسارات گسترده‌ای از جهت تلفات و افت تولید در مزارع پرورش مرغ گوشتی، تخمگذار و مادر گوشتی در کشور ایجاد نموده است. استفاده گسترده از واکسن‌های زنده و غیرفعال نیوکاسل سطح ایمنی را تا حد زیادی افزایش می‌دهد، اما هنوز بیماری نیوکاسل مسئله مهمی در کشورهای در حال توسعه نظیر ایران می‌باشد. تحقیق حاضر با هدف تعیین توالی کامل ویروس نیوکاسل سویه IR Clone12 مشتق شده از سویه لاسوتا انجام گرفت. ابتدا ویروس به تخم‌مرغ جنین‌دار SPF ۱۰ روزه تزریق شد. پس از ۷۲ ساعت مایع آلانتوئیک جمع‌آوری شد. مایع آلانتوئیک با کمک سانتی‌فوژ دور بالا و گرادیان‌ت ساکارز به صورت مناسب تخلیص شد. RNA ویروسی با کیت تجاری مناسب استخراج شد. با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی (GSP) دو قطعه cDNA ساخته شد. بدون در نظر گرفتن جایگاه ژنی هفت جفت پرایمر طراحی و ژنوم ویروس با روش PCR آمپلی‌فای شد. هر محصول PCR طولی برابر با (۲-۲/۵ kb) را شامل می‌شد. محصول PCR از روی ژل آگارز یک در صد الکتروفورز استخراج و بر روی پلاسمید pJET1.2 به نسبت سه به یک ligate شد، در ادامه به باکتری TOP10 ترانسفورم شد. پس از تکثیر پلاسمید استخراج گردید. برای اطمینان از کلونینگ موفق آنزیم برش Bgl II استفاده شد. پلاسمیدها برای تعیین توالی به روش سنگر به شرکت تجاری معتبر ارسال شد. در نهایت با استفاده از نرم‌افزار مگا۵، تمام ۱۵۱۸۶ نوکلئوتید تعیین توالی گردید. و در Gene Bank با کد MH247189 به ثبت رسیده و قابل دسترسی می‌باشد. ORF شروع و پایان هر ژن مشخص شد.

کلمات کلیدی: ویروس بیماری نیوکاسل، کلونینگ، لاسوتا

- Veterinary Researches & Biological Products No 133 pp: 87-96

### Determination of the complete nucleotide sequence of Clone IR 12 strain derived from the LaSota strain of Newcastle Virus of Razi Institute

By: Salimi, A., (Corresponding Author) Razi Serum and Vaccine Research Institute, Karaj, Iran. Molouki, A., Razi Serum and Vaccine Research Institute, Karaj, Iran. Godarzi, H., Razi Serum and Vaccine Research Institute, Karaj, Iran. Ebrahimi, S. R., Razi Serum and Vaccine Research Institute, Karaj, Iran. Ebrahimi, M. M., Razi Serum and Vaccine Research Institute, Karaj, Iran. and Khalesi, B., Razi Serum and Vaccine Research Institute, Karaj, Iran.

Received: 2019-10-14 Accepted: 2020-09-15

Email: ayuobsalimi@yahoo.com

Newcastle disease (ND) is an important viral disease of poultry causing severe economic losses and drop in egg production in broiler and layers flocks. Despite vaccination with both live attenuated and inactivated NDV strains to immunize birds, ND is still a serious problem in poultry industry especially in developing countries like Iran. plaque purified NDV strain clone IR12 produced by Razi Institute was propagated in 10-day-old SPF embryonated chicken eggs, then allantoic fluid was harvested. The virus was purified using sucrose-gradient. RNA was extracted and cDNA spanning the whole genome was synthesized using two GSP primers. PCR was run using 7 sets of primers covering the whole cDNA. The PCR products were all gel extracted and ligated to pJET1.2 vector by 3-1 ratios. Successful cloning of each insert was confirmed using restriction enzyme BglII that digests areas flanking the insert in pJET. After confirmation, the inserts were sequenced using Sanger sequencing with pJET specific primers as well as primers designed to bind to middle regions of each fragment. Sequence of the whole 15186 bp genome was determined by assembling sequences using MEGA 5 software. Location of each start (S) and ending (E) gene signals as well as all ORF start and termination codons were determined.

**Key words:** Newcastle disease virus, cloning, sequencing

### مقدمه

بیماری نیوکاسل طیور از مهم‌ترین بیماری‌های صنعت طیور می‌باشد که سالانه هزینه اقتصادی زیادی را بر این صنعت تحمیل می‌کند. ویروس‌های عامل این بیماری می‌توانند طیف گسترده‌ای از پرندگان را آلوده کنند. بطوری‌که علاوه بر ماکیان، بوقلمون، بلدرچین، گنجشک، طوطی و حتی پرندگان منحصراً گوشتخوار نیز از دست این بیماری در امان نیستند (۲). علائم بیماری نیوکاسل با توجه به نوع ویروس، میزان سلامتی و سن پرنده و گونه میزبان متفاوت است. این علائم شامل نشانه‌های تنفسی همچون تنگی نفس و سرفه، نشانه‌های عصبی چون افسردگی، بی‌اشتهایی، افتادن بال‌ها و فلجی، پیچ خوردن سر و گردن، به دور خود چرخیدن، لرزش، تورم چشم و گلو، اسهال آبکی و سبز و ناهنجاری و افت تولید تخم در پرندگان تخم‌گذار می‌شود (۱). سویه‌های این ویروس بر اساس علائم و شدت پاتولوژی به چهار دسته تقسیم می‌شوند. ولوژنیک با علائم شدید شامل علائم عصبی و گوارشی می‌باشد که تلفات صد در صدی دارد سویه‌های مزوژنیک که بیماری ایجاد می‌کند و علائم آن که بیشتر گوارشی می‌باشد اما تلفات بالایی ندارد، و سویه‌های لنتوژنیک با علائم بسیار خفیف که

سویه‌های واکسینال از این گروه و سویه‌ها انتخاب می‌شوند و سویه‌های بدون علامت گوارشی که بعضاً علائم آن تشخیص داده نمی‌شوند (۲). ویروس بیماری نیوکاسل گروه متنوعی از ویروس‌های متعلق به پارامیکسوویروس پرندگان است که در دو سرگروه اصلی تقسیم می‌شود و هر گروه دارای سروتیپ‌های مختلف می‌باشد. ویروس نیوکاسل جنس آویولاویروس از خانواده پارامیکسوویریده می‌باشد. این ویروس‌ها نوکلئوکسپیدی با تقارن بیست وجهی و به قطر ۱۸nm دارند. ویروس غشای لیپیدی خود را از سطح سلول میزبان می‌گیرد و قطری حدود ۸-۱۲ nm دارند. در سطح این ویروس گلیکوپروتئین‌های سطحی در دو نوع مختلف از غشاء ویروس خارج شده‌اند، طول این زوائد گلیکوپروتئین‌ها بسته به سروتیپ ویروس ۸-۲۰ nm می‌باشد (۱). ژنوم ویروس دارای RNA تک رشته‌ای با سنس منفی می‌باشد. به طور دقیق تعیین توالی نوکلئوتیدی ژنوم ویروس بیماری نیوکاسل نشان داده است که ژنوم آن‌ها دارای سه طول مختلف شامل ۱۵۱۸۶ نوکلئوتید و ۱۵۱۹۲ و ۱۵۱۹۸ نوکلئوتید می‌باشد. که شش پروتئین اصلی را کد می‌کند (۴). این پروتئین‌ها عبارتند از: پروتئین نوکلئوکسپید (NP)، فسفو پروتئین (P)، پروتئین

روش داخل فضای آلانتوئیک تزریق شد. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در هر ۲۴ ساعت کندلینگ انجام و در نهایت پس از پایان ۷۲ ساعت تخم‌مرغ‌ها با هدف بسته شدن عروق خونی به سردخانه منتقل شد و پس از بسته شدن عروق خونی به صورت استریل مایع آلانتوئیک آن‌ها جمع‌آوری شد. پس از اطمینان از رشد ویروس بیماری نیوکاسل به منظور خالص‌سازی مایع آلانتوئیک از سانتریفیوژ دور بالای SURVALL مدل RC2-B استفاده شد. ابتدا به منظور ته نشینی گلبول قرمز و عوامل دیگر مایع آلانتوئیک در ظروف مخصوص (JA 14) ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و مایع‌رویی جمع‌آوری شد (۵). مرحله دوم، برای رسوب ویروس، مایع جمع‌آوری شده با لوله‌های (JA 20) به مدت دو ساعت با دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. مایع‌رویی دور ریخته شد و پلیت انتهایی تشکیل شده به همراه ۱۱۰۰ μl PBS جمع‌آوری شد و در دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت توسط گرادینت ساکارز ویروس خالص‌سازی گردید.

### استخراج RNA

با استفاده از کیت استخراج (Roche) ژنوم RNA ویروس جدا شد و در مرحله

ماتریکس (M)، پروتئین ادغام (F)، پروتئین هم‌گلوتنین - نورآمینیداز (HN) و پروتئین (L)، اساس بیماری‌زایی ویروس بیماری نیوکاسل تجزیه پروتئولیتیک پیش‌ساز پروتئین فیوژن (F0) به دو تحت واحد F1-F2 است که توسط باندهای دی‌سولفیدی به هم متصل می‌باشد (۶). برای تعیین توالی کامل ویروس روش‌های مختلفی وجود دارد که روش کلونینگ یکی از روش‌های معمول می‌باشد در این تحقیق ویروس کلون شده سویه واکسینال لاسوتای موسسه رازی با هدف شناسایی کامل ۱۵۱۸۶ توالی نوکلئوتید ژنومی و همین‌طور مقایسه با سایر ویروس‌ها این خانواده انتخاب گردید (۱۰، ۱۵). البته در کنار این روش از NGS نیز می‌توان استفاده کرد اما با توجه به هزینه گران آن و عدم دسترسی به ابزارهای لازم آن در کشور، هنوز کلونینگ یکی از بهترین روش‌ها می‌باشد (۸).

### مواد و روش‌ها

#### تکثیر و خالص‌سازی ویروس

برای این منظور سویه IR 12 که ویروس کلون شده به روش پلاک اسی از سویه لاسوتای نیوکاسل می‌باشد (۱۰). از بخش تحقیق و تولید واکسن و فرآورده‌های بیولوژیک طیور موسسه رازی تهیه شد و با رقت ۱۰۵ به ۱۰۰ عدد تخم‌مرغ (SPF) جنین‌دار ۱۰ روزه به

جدول ۱- پرایمرهای طراحی شده برای قطعات مختلف ژنوم ویروس برای انجام PCR.

موقعیت	طول محصول	توالی	تعداد باز
1-24	۲۵۳۷	5'-ACCAAACAGAGAATCCGTGAGTTA	۲۴
2530-2550		5'-CTACAGGTGGCTGGACATGA	۲۰
2479-2499	۲۵۲۶	5'-TCATGCTCTCCGATCAAGGC	۲۰
4985-5005		5'-AAGTCGGAGGATGTTGGCAG	۲۰
4933-4953	۲۵۲۳	5'-ACTGCCGCACAAATAACAGC	۲۰
7435-7455		5'-TTGCTCATCTGGGCATGTGT	۲۰
7332-7452	۱۸۳۳	5'-ATTGACAGCCGCTATGGTT	۲۰
9240-9263		5'-CGTATGCAAATCCCTCCATTAGT	۲۳
9195-9215	۲۰۳۱	5'-CGCTCTGGCAAAGACTTGG	۲۰
11206-11226		5'-CCCCTGCTTCTAGTCGCTT	۲۰
11102-11123	۲۰۵۷	5'-ATGTTCTGACTCCTGCCCAAT	۲۱
13138-13159		5'-GTACAGACAGCATAACCGGGA	۲۱
13089-13114	۲۰۹۷	5'-CCCCTCTGTCTTAGATGATAACCTG	۲۵
15160-15186		5'-ACCAAACAAAGATTGGTGAATGACG	۲۶

یک در صد آگارز تهیه شد. ابتدا مقدار یک ul از محصول PCR روی ژل بارگذاری شد و پس از اطمینان از نتیجه آن، برای اینکه تمام محصول بارگذاری شود چاهک‌های بزرگ در نظر گرفته شد و هر قطعه در کنار مارکر ۱۰۰ bp کمپانی (Vivantis) بارگذاری گردید. تانک الکتروفورز به یک منبع تغذیه الکتریکی با ولتاژ حدود ۷۰۰ v متصل شد پس از مدت ۷۰ دقیقه ژل از داخل تانک برداشته شد. در نهایت در دستگاه آشکار ساز (ژل داگ) باند هر قطعه مشاهده شد و نمونه با دقت و رعایت اصول حفاظتی از اشعه UV توسط تیغ اسکالپل به سرعت جدا گردید تا قطعات ژنومی تحت تاثیر اشعه UV تغییر نکند (۱۲). برای استخراج از روی ژل از کیت استخراج شرکت (Roche) استفاده شد. طبق دستورالعمل کیت DNA از روی ژل استخراج و با نانودراپ غلظت آن سنجیده شد. در نهایت آماده کلون بر روی وکتور شد.

### کلونینگ

کلونینگ بر پایه وکتور pJET1.2 که دارای طول ۲۹۷۴ و می‌تواند قطعات Blunt را حمل کند انجام شد این وکتور دارای نشانگر ژن مقاومت آمپی‌سیلین می‌باشد. سلول میزبان نیز باکتری مهندسی شده TOP ۱۰ انتخاب شد این سلول مستعد قبل از ligation تهیه و با کمک CaCl<sub>2</sub> حفرات مناسب برای ترانسفورماسیون در آن ایجاد شد. انتقال قطعه با مقدار ۴ ul از محصول PCR به همراه یک ul پلاسمید و یک ul T4 DNA Ligase به همراه ۱۰ ul بافر در حجم نهایی ul ۲۰ انجام شد. انتقال با شوک حرارتی انجام شد. کشت در محیط LB Agar حاوی ۵۰ μg آمپی‌سیلین در هر ml انجام شد. پس از ۱۶ ساعت پرگنه‌های سفید رنگی ایجاد شد. پرگنه‌ها استحصال و در نهایت پلاسمید آن طبق پروتکل Ashbrook استخراج گردید (۱۴). برای اطمینان از وجود قطعه مورد نظر به صورت همزمان از PCR کلونی و برش آنژیمی BglIII استفاده شد که بدون ایجاد برش روی قطعه کلون شده، دو برش روی پلاسمید در دو طرف ناحیه MCS ایجاد می‌کند.

آخر استخراج تیوب میکروسانتیفوژ مقدار یک ul نمونه ممانعت کننده از تجزیه RNA به آن اضافه شد، در نهایت غلظت آن با روش نانودراپ سنجیده شد و مستقیماً برای آزمون تهیه cDNA مورد استفاده قرار گرفت (۷).

### تهیه cDNA

برای ساخت cDNA ابتدا دو پرایمر (GSP) برای ساخت این دو پرایمر از پرایمرهای طراحی شده پیتز و همکاران استفاده شده است. (۱۵) شرکت (سینا کلون) تهیه شد. ۱/۱۵ μ از پرایمر اول به همراه ۱۵ μ از RNA ویروس و ۵/۵ μ آب در یک میکروتیوب ریخته و به مدت پنج دقیقه و دردمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از این مرحله به همراه ۴ ul بافر و ۲ ul dNTP و در نهایت یک ul آنزیم RT در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت یک ساعت انجام شد. همین کار برای قطعه دوم با پرایمر دوم انجام شد (۱۴).

### واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

با توجه به طول ویروس بیماری نیوکاسل (بیش از ۱۵ kb) و طول مناسب برای مرحله کلونینگ، بدون توجه به طول پروتئین‌ها و جایگاه ژنومی هفت جفت پرایمر با استفاده از مقاله پیتز و همکاران (AF۰۷۷۷۶۱) در سال ۱۹۹۹ و پروتکل آن (۱) و همین طور با کمک نرم‌افزارهای پرایمر ۳ و OligodT برای طول ژنوم ویروس طراحی شد و پس از تعیین توالی بیشترین شباهت و هم‌خوانی را در نتیجه بلاست کردن توالی با توالی ذکر شده داشت. هر قطعه فراگمنت به اختصار Frag نامگذاری شد (frag-۱\*۲\*۳\*۴\*۵\*۶\*۷). آزمایش PCR به همراه آنزیم Pfu که خاصیت تصحیح اشتباه (proofreading) را نیز دارد به ترتیب، برای هر قطعه در حجم نهایی ul ۵۰ در سیکل دمایی ذکر شده در جدول یک انجام شد.

### الکتروفورز محصول PCR و استخراج از روی ژل

محصول PCR در هر مرحله برای هر کدام از قطعات بدست آمد. ژل

جدول ۲- تایج همردیف سازی سکانس کامل با سکانس های بانک ژن.

AUTHORS	ACCESSION	AF077761	JF950510	AY845400	KC844235	Y18898	MH247189
de Leeuw, O. and Peeters, B(1998)	AF077761						
Lu, Y., Zhao, H.(2011)	JF950510	۰,۰۰۷					
Bu, Z., Ge, J., Hu, S. and Wen, Z(2005)	AY845400	۰,۰۰۴	۰,۰۰۸				
Zhang, X.L., Meng, C.C.(2013)	KC844235	۰,۰۰۶	۰,۰۰۲	۰,۰۰۸			
Romer-Oberdorfer, A., Mundt, E(1999)	Y18898	۰,۰۰۷	۰,۰۰۲	۰,۰۰۸	۰,۰۰۱		
Clone_IR12_-_Molouki_et_al_2019	MH247189	۰,۰۰۶	۰,۰۰۲	۰,۰۰۸	۰,۰۰۱	۰,۰۰۱	

تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی با طول ۱۵۱۸۶ نوکلئوتید در Gene Bank با کد MH247189 به ثبت رسیده و قابل دسترسی می‌باشد. توالی‌های مشخص شده به کمک نرم‌افزار مگا ۵ مرتب شد. تمام ۱۵۱۸۶ نوکلئوتید مشخص و سپس در مرحله بعد نتایج بدست آمده با توالی‌های کامل موجود در بانک ژنوم مقایسه شد. در انتخاب توالی‌های مناسب برای هم‌ترازی نمونه‌ها سعی بر آن شد که همه آن‌ها سویه لتوژنیک لاسوتا با طول ۱۵۱۸۶ نوکلئوتید باشند. پنج توالی مناسب انتخاب شد (جدول ۲). مهم‌ترین سکانس انتخاب شده سویه تعیین سکانس شده سال ۱۹۹۹ توسط آقای «پیترز» و همکاران بود که در این مطالعه از توالی آن برای تهیه پرایمر استفاده شده بود. هم‌ردیف‌سازی با بوت استرب ۵۰۰ انجام شد (۱۷،۱۸).

برای این منظور ابتدا یک ul از نمونه در یک میکروتیوپ ریخته شد و یک ul از آنزیم به همراه بافر آنزیم مورد نظر به آن اضافه شد. دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای کسب نتیجه بهتر پلاسمیدهای بدست آمده به صورت مستقیم PCR انجام شد. سپس نتیجه هر دو روش را بر روی ژل آگارز یک درصد برده و نتیجه بررسی شد (۱۹). نمونه‌ها با مشخصات و شرایط خواسته شده از شرکت تجاری، به همراه توالی پرایمرها به منظور تعیین سکانس ارسال شد. برای نتیجه بهتر از هر قطعه کلون شده سه نمونه مختلف ارسال شد.

### نتایج

توالی کامل سویه IR Clone.12 سویه لاسوتای ویروس نیوکاسل مؤسسه

Species/Abbr/ Group Name																																																																		
1. Sequence_1IR 12	C	T	C	A	G	G	C	T	C	A	G	G	A	G	T	A	C	A	T	A	A	C	A	G	G	A	T	A	T	G	G	C	T	C	C	C	A	G	G	C	T	A	A	A	G	C	T	A	G	C	C	C	C	A	G	C	A	G	C	A	G	G	A	G	G	G
2. Sequence_2Peeters	C	T	C	A	G	G	C	T	C	A	G	G	A	G	T	A	C	A	T	A	A	C	A	G	G	A	T	A	T	G	G	C	T	C	C	C	A	G	G	C	T	A	A	A	G	C	T	A	G	C	C	C	C	A	G	C	A	G	C	A	G	G	A	G	G	
3. Sequence_3zhao	C	T	C	A	G	G	C	T	C	A	G	G	A	G	T	A	C	A	T	A	A	C	A	G	G	A	T	A	T	G	G	C	T	C	C	C	A	G	G	C	T	A	A	A	G	C	T	A	G	C	C	C	C	A	G	C	A	G	C	A	G	G	A	G	G	
4. Sequence_4romer	C	T	C	A	G	G	C	T	C	A	G	G	A	G	T	A	C	A	T	A	A	C	A	G	G	A	T	A	T	G	G	C	T	C	C	C	A	G	G	C	T	A	A	A	G	C	T	A	G	C	C	C	C	A	G	C	A	G	C	A	G	G	A	G	G	
5. Sequence_5zhany	C	T	C	A	G	G	C	T	C	A	G	G	A	G	T	A	C	A	T	A	A	C	A	G	G	A	T	A	T	G	G	C	T	C	C	C	A	G	G	C	T	A	A	A	G	C	T	A	G	C	C	C	C	A	G	C	A	G	C	A	G	G	A	G	G	
6. Sequence_6bu	C	T	C	A	G	G	C	T	C	A	G	G	A	G	T	A	C	A	T	A	A	C	A	G	G	A	T	A	T	G	G	C	T	C	C	C	A	G	G	C	T	A	A	A	G	C	T	A	G	C	C	C	C	A	G	C	A	G	C	A	G	G	A	G	G	

شکل ۱- تصویر قسمتی از سکانس ژن NP که ردیف اول نشان دهنده ژن مورد مطالعه (IR 12)، و ردیف دوم سکانس آقای پیترز (۱۵) و ردیف‌های بعدی سکانس‌های موجود در بانک ژن شماره ۳: (۲۰)\* شماره ۴: (۱۶)\* شماره ۵: (۱۸). \*شماره ۶: (۱۷)

Species/Abbr/ Group Name																																																																				
1. Sequence_1	K	N	K	Q	L	W	R	L	Y	R	K	D	N	A	P	V	T	L	L	G	S	D	G	S	F	A	P	A	E	Y	A	L	Y	S	F	A	M	G	M	A	V	L	K	G	T	S	K	Y	D	F	A	R	D	F	M	S	T	S	F	R	L	S	E	Y	A	Q	A	D
2. Sequence_2	K	N	K	Q	L	W	R	L	Y	R	K	D	N	A	P	V	T	L	L	G	S	D	G	S	F	A	P	A	E	Y	A	L	Y	S	F	A	M	G	M	A	V	L	K	G	T	S	K	Y	D	F	A	R	D	F	M	S	T	S	F	R	L	S	E	Y	A	Q	A	D
3. Sequence_3	K	N	K	Q	L	W	R	L	Y	R	K	D	N	A	P	V	T	L	L	G	S	D	G	S	F	A	P	A	E	Y	A	L	Y	S	F	A	M	G	M	A	V	L	K	G	T	S	K	Y	D	F	A	R	D	F	M	S	T	S	F	R	L	S	E	Y	A	Q	A	D
4. Sequence_4	K	N	K	Q	L	W	R	L	Y	R	K	D	N	A	P	V	T	L	L	G	S	D	G	S	F	A	P	A	E	Y	A	L	Y	S	F	A	M	G	M	A	V	L	K	G	T	S	K	Y	D	F	A	R	D	F	M	S	T	S	F	R	L	S	E	Y	A	Q	A	D
5. Sequence_5	K	N	K	Q	L	W	R	L	Y	R	K	D	N	A	P	V	T	L	L	G	S	D	G	S	F	A	P	A	E	Y	A	L	Y	S	F	A	M	G	M	A	V	L	K	G	T	S	K	Y	D	F	A	R	D	F	M	S	T	S	F	R	L	S	E	Y	A	Q	A	D
6. Sequence_6	K	N	K	Q	L	W	R	L	Y	R	K	D	N	A	P	V	T	L	L	G	S	D	G	S	F	A	P	A	E	Y	A	L	Y	S	F	A	M	G	M	A	V	L	K	G	T	S	K	Y	D	F	A	R	D	F	M	S	T	S	F	R	L	S	E	Y	A	Q	A	D

شکل ۲- بخشی از توالی اسید آمینه‌های پروتئین NP که بصورت کامل با توالی‌های دیگر هم‌ردیف هستند\* شماره یک (IR 12)\* شماره ۲ (۱۵) شماره ۳: (۲۰)\* شماره ۴: (۱۶)\* شماره ۵: (۱۸). \*شماره ۶: (۱۷)



۹۰ ایزولوسین جای سیستمین قرار گرفته است. این تغییرات در نوکلئوتید سوّم کدون هر اسید آمینه در توالی نوکلئوتیدی است.

### نتایج مقایسه سکانس پروتئین F

با توجه به اینکه این پروتئین مهم‌ترین نقش را در تعیین حدت ویروس دارد و هر گونه تغییر به خصوص در جایگاه شکست (۱۱۲-۱۱۷) آمینواسیدی پروتئین می‌تواند در ویروالانس این ویروس مؤثر باشد، به همین خاطر نتایج این سکانس با دقت بیشتری به صورت زیر تحلیل شد. توالی‌های تعیین حدت در توالی‌های بین ۱۱۲-۱۱۷ نمونه مورد مطالعه دقیقاً حفظ شده که حدت و سویه لنتوژنیک آن را اثبات می‌کند. همین‌طور این نمونه با سکانس آقای «پیترز» در توالی اسید آمینه به صورت صد در صد هم‌ریف می‌باشد. همان‌طور که مشخص است این توالی با نمونه سکانس شده چینی (۱۶) در جایگاه نوکلئوتید ۳۵۷ متفاوت می‌باشد.

در این مطالعه شش ژن اصلی از ویروس به طور جداگانه مقایسه و نقاط اختصاصی هر ژن مشخص شد و در نهایت تمام ۱۵۱۸۶ نوکلئوتید ویروس کلون شده نیوکاسل مشخص و تعیین شد.

### نتایج مقایسه سکانس پروتئین NP

این توالی تغییراتی را نسبت به توالی بانک ژن نشان داد. این تغییرات با نتایج سکانس شده در سال ۱۹۹۹ که توسط آقای «پیترز» انجام شده بود به صورت زیر است. آنچه در هم‌ریف‌سازی توالی پروتئینی با سکانس آقای «پیترز» مشاهده شد، تغییر نوکلئوتید سیتوزین و تیمین به جای گوانین به ترتیب در جایگاه‌های ۱۲۰۳ و ۱۲۰۶ می‌شود همچنین جایگزینی آدنین به جای تیمین در جایگاه ۱۲۲۱ که باعث تغییر اسید آمینه تیروزین به جای اسپارژین می‌شود (شکل ۲) و همین‌طور در جایگاه

Species/Abbr/Group Name																																																		
Sequence 1 ir	C	T	A	C	A	T	C	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	A	C	A	G	G	G	C	C	T	T	A	G	G	C	C	A	T	T	A	T	T	G	C	G	G	T	G	G	C	T	C	T	T
Sequence 2 peeters	C	T	A	C	A	T	C	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	A	C	A	G	G	G	C	C	T	T	A	G	G	C	C	A	T	T	A	T	T	G	C	G	G	T	G	G	C	T	C	T	T
Sequence 3 zoa	C	T	A	C	A	T	C	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	A	C	A	G	G	G	C	C	T	T	A	G	G	C	C	A	T	T	A	T	T	G	C	G	G	T	G	G	C	T	C	T	T
Sequence 4 romer	C	T	A	C	A	T	C	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	A	C	A	G	G	G	C	C	T	T	A	G	G	C	C	A	T	T	A	T	T	G	C	G	G	T	G	G	C	T	C	T	T
Sequence 5 zang	C	T	A	C	A	T	C	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	A	C	A	G	G	G	C	C	T	T	A	G	G	C	C	A	T	T	A	T	T	G	C	G	G	T	G	G	C	T	C	T	T
Sequence 6 bu	C	T	A	C	A	T	C	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	A	C	A	G	G	G	C	C	T	T	A	G	G	C	C	A	T	T	A	T	T	G	C	G	G	T	G	G	C	T	C	T	T

شکل ۳ - توالی نوکلئوتیدی ژن F و نقاط تعیین حدت.

شماره یک: (IR 12) \* شماره دو: (۱۵) \* شماره سه: (۱۶) \* شماره چهار: (۱۸) \* شماره پنج: (۱۷) \* شماره شش: (۲۰)

Species/Abbr/Group Name																				
1. Sequence 1	I	Q	E	S	V	T	T	S	G	G	R	Q	G	R	L	G	A	I	I	G
2. Sequence 2	I	Q	E	S	V	T	T	S	G	G	R	Q	G	R	L	G	A	I	I	G
3. Sequence 3	I	Q	E	S	V	T	T	S	G	G	R	Q	G	R	L	G	A	I	I	G
4. Sequence 4	I	Q	E	S	V	T	T	S	G	G	R	Q	G	R	L	G	A	I	I	G
5. Sequence 5	I	Q	E	S	V	T	T	S	G	G	R	Q	G	R	L	G	A	I	I	G
6. Sequence 6	I	Q	E	S	V	T	T	S	G	G	R	Q	G	R	L	G	A	I	I	G

شکل ۴ - قسمتی از توالی پروتئینی ژن F و نقاط تعیین حدت مشخص شده است. سکانس اول سکانس مورد مطالعه (IR 12) و سکانس دوم مربوط به سکانس آقای

پیترز می‌باشد. \* شماره سه: (۲۰) \* شماره چهار: (۱۷) \* شماره پنج: (۱۸) \* شماره شش: (۱۶)

هیچ‌گونه تغییری نمی‌دهد و بین شش توالی یکسان می‌باشد. نتایج مقایسه توالی‌های دیگر نشان داد که این توالی‌ها در دو نوکلئوتید در نقاط مختلف ژنوم M با یکدیگر متفاوت می‌باشند، بدین‌معنی که هر توالی در دو نوکلئوتید به صورت اختصاصی متفاوت از پنج توالی‌های دیگر می‌باشد؛ اما در سطح پروتئین هیچ تفاوتی در بین شش سکانس مورد مقایسه دیده نمی‌شود (شکل ۵-).

### نتایج مقایسه سکانس پروتئین HN

پروتئین HN با توجه به اینکه مهم‌ترین نقش را در تحریک و تولید آنتی‌بادی در سویه‌های واکسینال دارند کوچک‌ترین تغییر می‌تواند نقش مهمی در آنتی‌ژنیستی آن داشته باشد. مطالعه این پروتئین نشان داد

توالی پروتئینی در جایگاه شکست نیز در شکل ۴- است که به صورت 112G-R-Q-G-R-L117 مشخص است. این نتیجه با مشخصات ویروس‌های لنتوژنیک به صورت زیر 112G/E-K/R-Q-G/E-R-L117 همخوانی دارد. توالی اسید آمینه مشخص شده در شکل ۴ نقش اصلی را در لنتوژنیک بودن ویروس دارند.

### نتایج مقایسه سکانس پروتئین M

نتایج مقایسه توالی مورد مطالعه در بین توالی‌های دیگر برای پروتئین M نشان داد که سکانس این توالی با توالی سکانس پنجم (۱۸) به طور کامل یکسان می‌باشد؛ اما با توالی‌های دیگر در دو نوکلئوتید متفاوت می‌باشد. این تفاوت در سطح پروتئین

Species/Abn	Group Name	Sequence
1.Sequence 1		KKQIAPQYRIQRDLNLTOSKEDSVFITTVGFIFQVGNEEATVGMIDDKPKRELLSAAMLCLGVPNTGDLIELAR
2.Sequence 2		KKQIAPQYRIQRDLNLTOSKEDSVFITTVGFIFQVGNEEATVGMIDDKPKRELLSAAMLCLGVPNTGDLIELAR
3.Sequence 3		KKQIAPQYRIQRDLNLTOSKEDSVFITTVGFIFQVGNEEATVGMIDDKPKRELLSAAMLCLGVPNTGDLIELAR
4.Sequence 4		KKQIAPQYRIQRDLNLTOSKEDSVFITTVGFIFQVGNEEATVGMIDDKPKRELLSAAMLCLGVPNTGDLIELAR
5.Sequence 5		KKQIAPQYRIQRDLNLTOSKEDSVFITTVGFIFQVGNEEATVGMIDDKPKRELLSAAMLCLGVPNTGDLIELAR
6.Sequence 6		KKQIAPQYRIQRDLNLTOSKEDSVFITTVGFIFQVGNEEATVGMIDDKPKRELLSAAMLCLGVPNTGDLIELAR

شکل ۵ - قسمتی از توالی پروتئینی ژن M سکانس اول سکانس مورد مطالعه (IR 12) و سکانس دوم مربوط به سکانس آقای پیتز (۱۵) می‌باشد. \* شماره سه: (۲۰)\*شماره چهار: (۱۶) \*شماره پنج (۱۸) \*شماره شش: (۱۷).

Species/Abn	Group Name	Sequence
Sequence 1		ACAGTCAAGCAACAACAGCCACTCTTCATAGTCCTTATACATTCAAATGCCTTCACTCGGCCAGGTAGTATCC
Sequence 2		ACAGTCAAGCAACAACAGCCACTCTTCATAGTCCTTATACATTCAAATGCCTTCACTCGGCCAGGTAGTATCC
Sequence 3		ACAGTCAAGCAACAACAGCCACTCTTCATAGTCCTTATACATTCAAATGCCTTCACTCGGCCAGGTAGTATCC
Sequence 4		ACAGTCAAGCAACAACAGCCACTCTTCATAGTCCTTATACATTCAAATGCCTTCACTCGGCCAGGTAGTATCC
Sequence 5		ACAGTCAAGCAACAACAGCCACTCTTCATAGTCCTTATACATTCAAATGCCTTCACTCGGCCAGGTAGTATCC
Sequence 6		ACAGTCAAGCAACAACAGCCACTCTTCATAGTCCTTATACATTCAAATGCCTTCACTCGGCCAGGTAGTATCC

شکل ۶ - قسمتی از توالی ژنومی ژن HN: سکانس اول سکانس مورد مطالعه (IR 12) و تغییر نوکلئوتید ۱۳۴۸ ژنومی مشخص است و سکانس دوم مربوط به سکانس آقای پیتز (۱۵) می‌باشد. \* شماره سه: (۲۰)\*شماره چهار (۱۶) \*شماره پنج: (۱۸) \*شماره شش: (۱۷).

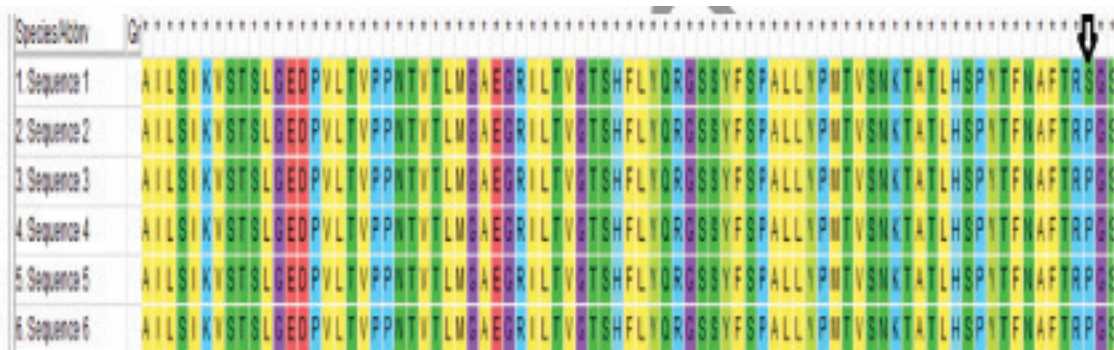
کل ژنوم ویروس بوده است. در یکی از مطالعات که توسط دکتر اسماعیل‌زاد و همکاران در موسسه رازی انجام شده است (۱۱) بررسی پروتئین F ویروس ولوژنیک از جدایه‌های داخل کشور نشان داد که این ایزوله در ژنوتیپ VII ساب ژنوتیپ VII-(j) قرار می‌گیرد که تفاوت‌هایی با ساب ژنوتیپ VII-(d) مورد انتظار داشته است (۱۱). در مقابل مطالعات دیگری در بخش‌های مختلف دنیا نشان‌دهنده تعیین توالی کامل سویه‌های مختلف این ویروس می‌باشد. پیشینه سکانس کامل سویه لاسوتای نیوکاسل به سال‌های قبل بر می‌گردد. به طوری که در سال ۱۹۹۹ آقای پیترز و همکاران با سکانس کامل سویه لاسوتا پیشنهاد دادند که توالی آن دارای خصوصیتی است که بهتر است به جای قرار گرفتن این زیر گروه ویروسی در جنس آوولا ویروس به صورت مجزا در یک جنس دیگری از زیرخانواده پارامیکسو ویروس‌ها قرار بگیرد. امری که در سال ۲۰۱۶ به پیشنهاد انجمن جهانی ویروس‌شناسی ویروس نیوکاسل تحت نام Avian avulavirus I (AV-1) قرار گرفت (۸).

با توجه به پیشرفت‌های چند سال اخیر و روش‌های نوین برای توالی‌یابی، جای خالی تعیین توالی کامل سویه‌های غالب و در کنار آن سوش‌های واکسینال در ایران احساس می‌شود. امروزه در دنیا سیر صنعت واکسن‌سازی به سمت استفاده از واکسن‌های با تکنولوژی بالا و واکسن‌های نوترکیب می‌باشد. شناخت توالی کامل سوش‌های واکسینال در کنار مطالعات بر روی ژنوتیپ‌های غالب و وحشی در کشور مهم به نظر می‌رسد. موسسه رازی در قالب طرح‌های مختلف با هدف دستیابی به ساخت واکسن نوترکیب گام‌های مهمی را برداشته است. فرایندی که می‌تواند جلوی خروج ارز از کشور را گرفته و باعث ارتقای صنعت واکسن‌سازی در ایران شود. در این مطالعه با تعیین توالی کامل ویروس لاسوتا، شناسنامه کامل این سویه واکسینال بدست آمد علاوه بر آن زمینه را برای استفاده از توالی سویه ویروسی

یک تغییر در سطح ژنومی و پروتئینی به صورت اختصاصی مربوط به سویه مورد مطالعه (IR 12) دیده می‌شود. به این صورت که در جایگاه ۱۳۴۸ نوکلئوتید تیمین به جای سیتوزین در مقایسه با سکانس‌های مورد مقایسه قرار گرفته است. این نوکلئوتید با حفظ پایداری در تمام پنج سکانس دیگر سیتوزین می‌باشد و ضمن اینکه این تغییر در سطح پروتئینی باعث تغییر در اسیدآمین‌ها می‌شود به صورتی که اسیدآمین‌ها سرین در جایگاه ۴۵۰ پروتئینی به جای پرولین قرار گرفته است (شکل ۶-۷). توالی‌های سکانس سویه‌های شماره دو، چهار و پنج به طور کامل با هم هم‌ردیف هستند و بیشترین تغییر در سطح ژنوم مربوط به سکانس شماره شش (۲۰) می‌باشد که در شش نوکلئوتید در جایگاه‌های مختلف با سکانس‌های دیگر به خصوص با سکانس (IR 12) متفاوت است که همه این تغییرات منجر به تغییر در توالی پروتئینی می‌شود. توالی شماره سه نیز در دو جایگاه نوکلئوتیدی با سکانس (IR 12) و توالی‌های دیگر متفاوت است که در ترجمه نیز باعث تغییر اسیدآمین‌ها می‌شود.

### بحث

با توجه به این که ویروس بیماری نیوکاسل در ایران بومی است، در این راستا موسسه رازی به عنوان یکی از بزرگ‌ترین قطب‌های تولید واکسن در خاورمیانه مهم‌ترین نقش را در پیشگیری از بیماری و تولید واکسن نیوکاسل در ایران دارد. این واکسن برای اولین بار به همت دکتر ولی .. سهراب و همکاران در سال ۱۳۳۶ در ایران تولید شده است و در سال‌های بعد در اختیار صنعت طیور برای استفاده قرار گرفت. در طی این سال‌ها تحقیقات زیادی بر روی حدت ویروس، تعیین ژنوتیپ‌های مختلف آن و بیماری نیوکاسل حاصل از آن انجام گرفته است (۱۰). بررسی‌های گذشته نگر به توالی ویروس نیوکاسل طیور در ایران نشان می‌دهد که این مطالعات روی بخشی از ژنوم صورت گرفته است و هدف از آن تعیین سروتیپ سویه‌های مختلف بر اساس یک ژن از



شکل ۷- قسمتی از توالی پروتئینی ژن HN: سکانس اول سکانس مورد مطالعه (IR 12) و تغییر اسید آمینه ۴۵۰ پروتئینی مشخص است و سکانس دوم مربوط به سکانس آقای پیترز (۱۵) می‌باشد. \* شماره سه: (۲۰) شماره چهار: (۱۶) شماره پنج: (۱۸) شماره شش: (۱۷).



and Technologies. *Emerging Infectious Diseases* 19: 93-98.

6. Das. M. Baro and Kumar S. 2019. Evaluation of imidazole and its derivative against Newcastle disease virus Infection in chicken: A drug repurposing approach. *Virus Research* 260:114-122.

7. De Leeuw, O and B. Peeters. 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. *Journal of General Virology* 80:131-136.

8. Diel, D.G., Sušta L. Cardenas Garcia .S. Killian M.L. Brown C.C. Miller P.J and Afonso C.L. 2012. Complete Genome and Clinicopathological Characterization of a Virulent Newcastle Disease Virus Isolate from South America. *Journal of Clinical Microbiology* 50:378-87.

9. Dortmans, J. C., B. Peeters and P. Koch. G. 2012 Newcastle disease virus outbreaks: vaccine mismatch or inadequate application. *Veterinary Microbiology* 160:17-20.

10. Ebrahimi, M.M., Shahsavandi. Shahla. Famil-Ghadakchi. H. Ghodsian and Abdoshah. M. 2014. Clone Purification, Characterization and Standardization of LaSota Strain for Developing a Live Vaccine against Newcastle Disease Virus. *Iranian Journal of Virology* 8:12-19.

11. Esmaelizad, M., Mayahi .V. Pashaei. M and Goudarzi. H. 2017. Identification of novel Newcastle disease virus sub-genotype VII-(j) based on the fusion protein. *Archives of Virology* 162:971-978.

12. Kalyanasundram., J. Hamid. A. Yusoff and K. Chia. S. L. 2018. Newcastle disease virus strain AF2240 as an oncolytic virus: A review. *Acta Trop* 183:126-133.

13. Kavitha Murulitharan, Khadijah Yusoff., Abdul Rahman Omar and Aidin Molouki. 2013. Characterization of Malaysian velogenic NDV strain AF2240-I genomic sequence: a comparative study. *Virus Genes* 46:431-440.

14. Molouki, A and B. Peeters. 2017. Rescue of recombinant Newcastle disease virus: current cloning strategies and RNA polymerase provision systems. *Archives of Virology* 162:1-12

15. Peeters, B., P. de Leeuw OS. Koch. G and Gielkens A.L. 1999. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *Journal of Virology* 73:5001-9.

16. Van, Borm., S. Rizotto LS. Ullmann L.S. Scagion G.P. Malossi C.D. Simão Cordeiro IM and Oliveira T.M. 2016. Complete Genome Sequence of a Vaccinal Newcastle Disease Virus Strain Isolated from an Owl (*Rhynoptynx clamator*). *Genome Announcements* 4:1243-1249.

17. Wang., Y. Yu. W. Huo N. Wang. W. Guo. Y. Wei. Q. Wang .X and Zhang. 2017. Comprehensive analysis of amino acid sequence

در تهیه واکسن نوتر کبب فراهم کرد. از آنجا که اولویت تهیه این نوع واکسن‌ها آگاهی کامل از توالی کامل ویروس استفاده شده می‌باشد در این مطالعه سعی شده است که از نقاط مناسب برای طراحی پرایمر استفاده شود که بتواند بیشترین همپوشانی و کمترین خطا را در نتایج به دنبال داشته باشد. در ادامه، نتایج بدست آمده می‌تواند به عنوان back bone تهیه واکسن نوترکبب با حداکثر اطمینان استفاده گردد. همچنین در این مطالعه بررسی‌ها نشان داد این توالی در برخی نقاط ژنومی دارای تغییرات منحصر به فرد یک نوکلئوتید به جای نوکلئوتید دیگری در مقایسه با توالی‌های دیگر می‌باشد. که برخی نیز در ترجمه باعث تغییر اسید آمینه می‌شوند. به عنوان مثال جایگزینی تیمین به جای سیتوزین در جایگاه ۱۳۴۸ ژن HN باعث می‌شود که اسید آمینه سرین به جای اسید آمینه پرولین در روی این ژن قرار بگیرد. ساختار اسید آمینه پرولین منحصر به فرد است بدین صورت که چون در آن عامل آمین متصل به کربن آلفا با زنجیره کناری به صورت حلقه درآمده است، در ساختار سوم پروتئینی بلافاصله بعد از این اسید آمینه ایجاد لولا در ساختار نهایی می‌کند و باعث پیچش ساختار نهایی پروتئین می‌شود. با توجه به اینکه این تغییر در ساختار پروتئین اتصال ویروس می‌باشد این نکته می‌تواند بر روند ورود ویروس به داخل سلول میزبان و در ادامه در روند ایمنی‌زایی این سویه واکسینال مهم باشد که نیاز به مطالعات میدانی می‌باشد. هر چند این مورد تنها تغییر این سویه در مقایسه با سویه‌های دیگر نبود ولی به نظر می‌رسد تغییرات دیگر که معمولاً جایگزینی یک آمینو اسید با آمینو اسید مشابه، تغییر آنچنانی ایجاد نمی‌کند هر چند که این تغییرات نیز به مطالعات تکمیلی و بیو انفورماتیک را طلب می‌کند. با توجه به اینکه هدف از این مطالعه بدست آوردن توالی کامل این سویه بود، به همین دلیل پیشنهاد می‌شود با تکیه بر این توالی مطالعات موثرتری درباره تاثیرات تغییرات ایجاد شده در سویه در رفتار ویروسی در بیان و روند عفونت‌زایی انجام شود.

#### منابع مورد استفاده

1. Ababneh, M., Dalab. A.E. Alsaad.S.R. A.I. Zghoul M.B and A. Natour. M.Q. 2012. Molecular characterization of a recent Newcastle disease virus outbreak in Jordan. *Research in Veterinary Science* 93:151-154.
2. Absalon, A., E. Marioano Matias. Vasquez. A. Morales. Garzon A and Cortes-Espinosa .D.V. Ortega R. 2012. Complete genome sequence of a velogenic Newcastle disease virus isolated in Mexico. *Virus Genes* 45:304-310.
3. Aldous, E.W and D.J. Alexander. 2001. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol Pathology* 30:117-28.
4. Alexander, D.J., E.W. Aldous and C.M. Fuller. 2012. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathology*. 41: 329-335.
5. Bloom, B.S and Sharon. 2013. The Foundations of Virology: Discoverers and Discoveries, Inventors and Inventions, Developers

diversity at the F protein cleavage site of Newcastle disease virus in fusogenic activity. *plos one* 12: 18-23.

18. Wen. G., Shang. Y. Guo J. Chen C. Shao H. Luo Q. Yang .J. Wang. H and Cheng G. 2013. Complete genome sequence and molecular characterization of thermostable Newcastle disease virus strain TS09-C. *Virus Genes* 46:542-5.

19. Yadav. K., Pathak .D.C. Saikia DP. Debnath A. Ramakrishnan S and S. Chellappa MM. 2018. Generation and evaluation of a recombinant Newcastle disease virus strain R2B with an altered fu-

sion protein cleavage site as a vaccine candidate. *Microbial Pathogenesis* 118:230-237.

20. Yurchenko, K.S., Yurchenko. Kseniya. S. Sobolev. Ivan A. Glushchenko. Alexandra and Shestopalov. Alexander. M. 2015. Complete Genome Sequence of Genotype Ib Newcastle Disease Virus Isolated from a Mallard (*Anas platyrhynchos*) in Russia. *Genome announcements* 3: 1414-15.

21. Zhang, L., SK. Natarajan and DF Becker. 2012. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid Redox Signal* 19 (9):998-1011

