مقایسه چهار کیت استخراج RNA تجاری به منظور تشخیص ویروس ویرمی بهاره کپور معمولی

(Spring Viraemia of Carp Virus)SVCV

سیدرضاسیدمرتضایی [۱]*، مجتبی علیشاهی [۲]، مسعودرضاصیفی آبادشاپوری [۳]، محدث قاسمی [۴]

* rmortezaei@yahoo.com

۱-پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور – ص.پ. ۶۱۶۴۵/۸۶۶

۲و ۳-دانشکده دامپزشکی دانشگاه چمران اهواز

۴- پژوهشکده آبزی پروری آب های داخلی بندر انزلی

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۲ **تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۲**

چکیده

ویرمی بهاره کپور (SVC)، توسط ویروسی با RNA تک رشته ای منفی از خانواده رابدوویریده ایجاد می شود. ویروس SVCV عامل اصلی بیماری مسری ویرمی بهاره کپور در سرتاسر جهان بخصوص در ماهی کپور معمولی پراکنده است و در دیگر خانواده های ماهیان شامل اردک ماهیان ، کپور ماهیان دندانه دار ، خورشید ماهیان ، گربه ماهیان و آزاد ماهیان نیز سبب بیماری می گردد.

در این مطالعه به منظور دستیابی به روشی مناسب برای استخراج RNA ویروس SVCV، کارایی چهار کیت مختلف برای استخراج RNA از سویه SVCV ۵۶/۷۰ تکثیر یافته در کشت سلولی، مورد مقایسه قرار گرفتند. دو کیت بر اساس استفاده از روش ماده گوانیدین تیوسانات و فنل – کلروفرم (IQ2000 RNA Extraction ساخت تایوان و RNX-PLUS ساخت سیناژن، ایران) و دو کیت بر اساس روش ستونی (تجاری Cinnapure(ساخت سیناژن، ایران) و High Pure RNA Isolation Kit (Roche، آلمان) جهت جداسازی RNA مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که میزان غلظت RNA استخراج شده با کیت های Roche و Cinapure (به ترتیب ۳۱/۷۶ و ۱۶/۲۱ میکروگرم بر میکرولیتر) بیشتر از دو روش فنل – کلروفرم بوده است . همچنین بجز کیت IQ2000 kit دیگر کیت ها در RT-PCR باند ۴۸۰bp بر روی ژل الکتروفورز را نشان دادند . همچنین RNA استخراج شده در روش کیت تجاریIQ2000 kit دارای غلظت کمتری بود . در نهایت در این تحقیق استخراج RNA با روش ستونی به مراتب از نظر خلوص و غلظت بهتر از روش های فنل – کلروفرم مشاهده گردید.

لغات کلیدی: بیماریهای ویروسی، کپور ماهیان، روش های مولکولی

---

*نویسنده مسئول

مقدمه

یکی از مهم ترین عوامل موثر در افزایش تولید آبزیان پرورشی رعایت بهداشت و کنترل بیماریها می باشد. در میان عوامل بیماریزا، نقش ویروس ها از همه بارزتر بوده و خسارات وارده نیز به علت درمان ناپذیری، مسری بودن، تشخیص دشوار ، بسیار بیشتر از سایر عوامل بیماری زا می‌باشد (W0lf,1988) . در ایران نیز در طی دهه گذشته تولید و تکثیر و پرورش آبزیان بالاخص ماهی از رشد فزاینده ایی برخوردار بوده، بطوریکه هم اکنون ایران به یکی از قطب های تولید ماهیان آب شیرین در منطقه خاورمیانه تبدیل شده است. از حدود ۲۰۰۰۰۰ تن تولید ماهیان پرورشی کشور بیش از ۱۰۰ هزار تن مربوط به کپور ماهیان می باشد که حدود ۲۰٪ این تولید مربوط به کپور معمولی است (سالنامه آماری شیلات ایران،۱۳۹۰). بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت حیوانات (OIE) بیش از هفت بیماری ویروسی لازم الاخطاردر ماهیان مشخص گردیده است که بر اساس نوع و گونه ماهی تعداد آنها در ماهیان مختلف متفاوت می‌باشد. از میان بیماری های لازم الاخطار مورد تایید OIE ،بیماری ویرمی بهاره کپور (SVC) عضو دایم سال های گذشته می باشد (OIE, 2012).

بیماری ویرمی بهاره کپور ماهیان یکی از مهمترین عوامل خسارات اقتصادی در مزارع پرورش کپور معمولی است ولی سایر گونه های کپور ماهیان مانند کپور سرگنده، کپور علفخوار، کپور نقره ای، سر مخروطی Orfe) و لای ماهی نیز به این بیماری حساس بوده و بطور طبیعی به بیماری آلوده می شوند (Wolf, 1988; Fijan, 2009 ; Garver *et al.,* 2007 ; Ahne *et al* 1999; Goodwin, *al*., 2002; Vicenova *et al*., 2011 ; Svetlana *et al.*, 2006) . شیوع بیماری و تلفات در بچه ماهیان زیر یکسال در فصل بهار که درجه حرارت میان ۱۸-۱۰ سانتی گراد است به بالای ۷۰٪ میرسد و این تلفات باعث زیان اقتصادی فراوان در صنعت آبزی پروری در اروپا ، آسیا و آمریکای شمالی در دهه اخیر شده، به طوریکه سالیانه ۴۰۰۰ تن تلفات در اروپا گزارش شده است (Zhang *et al.*, 2009 .; Yue *et al.* ,2008 ; Way *et al.*,2003; Teng *et al.*,2007) در ایران نیز در چند سال اخیر تلفات و زیان اقتصادی کپورماهیان پرورشی، بخصوص گونه های کپور نقره ای و کپور معمولی به بیش از ۹ میلیارد تومان رسیده است (گزارش غیر رسمی شیلات ، منتشر نشده)

بطور کلی یکی از جنبه های مهم RT-PCR استفاده از روشی مطمئن و کارآمد برای استخراج RNA سالم و تخریب نشده از نمونه های مورد آزمایش می باشد. زیرا مولکول RNA پایداری کمتری نسبت به DNA دارد و بویژه تحت تاثیر ریبونوکلئازها که به فراوانی در محیط وجود دارند، ملکول های RNA بسهولت تخریب می گردند.

در رابطه با SVCV نیز تمامی محققین شرط اصلی تشخیص ویروس با RT-PCR را در استفاده از RNA سالم از نظر کیفی و کمی دانسته اند. لذا، تاکنون محققین از روش های مختلفی برای استخراج RNA ویروس بهاره کپور استفاده نموده اند (Shivappa *et .l*, 2008 ; Hoffmann *et al.*,2002 ; Chen *etal*.,2008; Oreshkova *et al*.,1999 ; Miller *et al*.1998 ; Padhi *et al*., 2011) .

در مطالعه حاضر بمنظور دستیابی به روشی مناسب برای استخراج RNA SVCV، کارایی چهار پروتکل مختلف برای استخراج RNA از SVCV، تکثیر یافته در کشت سلولی، مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد وروش کار

سویه ویروسی و کشت سلولی : در این تحقیق از سویه ۵۶/۷۰ SVCV با شماره ثبت ژن Z37505/1 و نیز تیره سلولی EPC (Epithelioma Papulosum Cyprini) که هر دو در مرکز تشخیص ویروس شناسی بخش بیماری های آبزیان پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی شهرستان بندر انزلی نگهداری می شوند استفاده شد.

تکثیر و تعیین عیار SVCV: جهت تکثیر ویروس ، ابتدا ۱۵ میلی لیتر سلول (Epithelioma Papulosum Cyprini) EPC حاوی محیط کشت (Eagle, s Minimum Essential Medium) EMEM به اضافه ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (FBS) در گرمخانه ۲۲ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. هنگامی که تک لایه سلول‌های EPC حدود ۷۰ درصد از سطح ظرف فلاسک را پوشاندند، محیط کشت آن تخلیه و با حدود ۱۰ میلی لیتر بافر PBS شستشو داده شد.پس از آن ویروس مورد نظر به نسبت ۱ به ۱۰۰ در محیط کشت EMEM حاوی ۵ درصد FBS رقیق شد و ۱ میلی لیتر ار آن در فلاسک cm^2 ۲۵ تلقیح گردید. برای جذب ویروس برروی سلول‌ها، فلاسک به مدت یک ساعت در دمای ۲۲

درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در طی این زمان در فواصل ۱۰ـ۵ دقیقه، فلاسک چندین مرتبه به آرامی حرکت داده می‌شد تا جذب ویروس به شکل بهتری انجام شود. پس از گذشت این زمان مایع داخل فلاسک تخلیه گردید و حدود ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی ۵ درصد FBS در آن ریخته شد و فلاسک به انکوباتور۲۲درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. فلاسک کشت سلول هر ۲۴ ساعت با استفاده از میکروسکوپ معکوس بررسی گردید و هنگامی که آثار آسیب بافتی ناشی از رشد ویروس به صورت گسترده در تمام سطح ظرف مشاهده شد، فلاسک در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا منجمد شود. پس از گذشت چند ساعت از انجماد، فلاسک برای ذوب شدن در دمای آزمایشگاه قرار گرفت و سپس مایع داخل آن به عنوان محلول حاوی ویروس در میکروتیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری تقسیم و تا زمان استفاده در فریزر منفی۷۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. برای آگاهی از عیار ویروس تهیه شده، یکی از میکروتیوب‌های۰/۵ml حاوی ویروس از فریزر خارج و با روش Muench و Reed (۱۹۳۸) در کشت سلولی EPC در یک میکروپلیت ۹۶ حفره ای تعیین عیار شد (Pollard & Walker, 1990).

روش های استخراج RNA شامل دو روش (روش های ۱و۲) بر اساس استفاده از گوانیدین تیوسانات و فنل – کلروفرم و دو روش (روش های ۳ و ۴) خالص سازی ستونی بودند.

در روش استفاده از محلول های استخراج RNA کیت های تجاری IQ2000 (تایوان) و RNX-PLUS (سیناژن، ایران) ، در ابتدا ۱۵۰ میکرولیتر از ویروس SVCV تکثیر یافته در کشت سلولی با ۱ میلی لیتر محلول استخراج مخلوط و پس از تکان دادن ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد . سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شده و میکروتیوب حاوی این مواد پس از تکان دادن با دست به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ نگهداری گردید . متعاقبا یک مرحله سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰rpm بمدت ۱۵ دقیقه انجام ، و فاز آبی بالای لوله بعنوان فاز حاوی RNA به یک میکروتیوب جدید انتقال یافت. RNA موجود در فاز آبی با افزودن یک حجم ایزوپروپانول رسوب داده شد. در آخر رسوب حاصله با ۱ میلی لیتر اتانل ٪۷۵ شسته و پس از خشک شدن در ۳۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر درمان داده شده با ۰/۱ درصد دی اتیل پیروکربنات (DEPC) حل گردید.

در روش های خالص سازی ستونی از کیت های تجاری Cinnapure RNA(سیناژن، ایران) و High Pure Viral, RNA Kit (Roche، آلمان) استفاده گردید . در هر یک از این روش ها نیز ۱۵۰ میکرولیتر از ویروس طبق دستورالعمل با مواد موجود در کیت ها (محلول های لیز کننده و رسوب دهنده از کیت Cinnapure RNA و محلول لیز کننده و محلول حذف مهارکننده RNA از کیت High Pure Viral , RNA Kit,Roche مخلوط و هر مرحله سانتریفوژ ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه برای رسوب دهی پروتئین و جداسازی RNA از DNA از ستون های جذب کننده RNA عبور داده شد. در مرحله بعد ستون ها با محلول های شستشوی موجود در کیت ها (Solution Buffer) شسته و RNA متصل شده به ستون ها با ۳۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر درمان داده شده با DEPC جداسازی گردید .

استخراج RNA با هر یک از ۴ روش فوق حداقل در ۳ تکرار انجام گردید و RNA های خالص شده تا زمان آزمایش در فریزر منفی ۷۰ درجه نگهداری شدند.

جهت اندازه گیری غلظت RNA های استخراج شده از دستگاه نانودراپ (Thermo Scientific, USA) استفاده شد. به این منظور ابتدا هر نمونه با استفاده از بافر تریس ۱۰میلی مولار(pH =۷/۴) به نسبت ۱/۱۰ رقیق شده و سپس جذب نوری آن در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. در بررسی غلظت RNA بعنوان شاهد از آب مقطر استریل مخلوط شده به نسبت ۱/۱۰ با بافر تریس استفاده شد. از هر روش استخراج ۳ نمونه مورد سنجش قرار گرفت و سپس میانگین غلظت RNA استخراج شده با هر روش (بر حسب میکروگرم در میکرولیتر) همراه با انحراف معیار آن تعیین گردید. همچنین خلوص RNA های استخراج شده بر اساس نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر محاسبه شد. برای محاسبه غلظت RNA نمونه ها OD را در فرمول زیر گذاشته و غلظت نمونه بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر بدست می آید :

$$OD260 \times 50\times \text{ dilution factor} = ng/\mu l$$

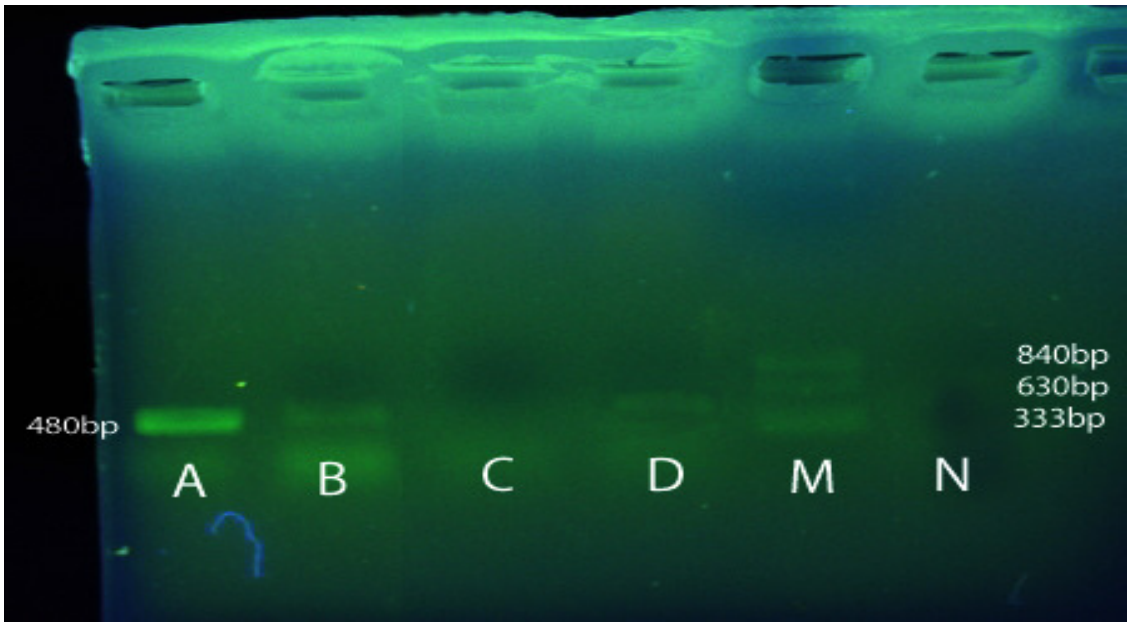
برای نمونه RNA عدد ۴۰ را بجای ۵۰ قرار داده می شود. OD برای RNA دارای ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نمونه مورد نظر است . (Ausubel *et al.* , 1992)

آزمایش رونوشت برداری معکوس و واکنش زنجیره ای پلیمراز (RT-PCR) بر روی RNAهای استخراج شده :

از RNA استخراج شده هر روشی ۳ نمونه برای سنجش اسپکتروفتومتریک میزان RNA با دستگاه نانوداپ Nanodrop و ۳ نمونه برای تهیه cDNA مورد استفاده قرار گرفت .برای تهیه cDNA، به هر نمونه ۱ میکرولیتر (۲۰ پیکومول) از پرایمر پیش برنده SVC F :5´TCT ATC ATC AGC TAC ATC GCA TT3´)) افزوده و نمونه به مدت 5 دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد حرارت داده شده سپس نمونه بلافاصله بر روی یخ سرد شده و به آن ۲ میکرولیتر بافر 10x ،۰/۵ میکرولیتر مهارکننده آنزیم های ریبونوکلئاز (Ribolock)، ۲ میکرولیتر dNTPs افزوده شد. میکروتیوب حاوی این مخلوط ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از افزودن ۱ میکرولیتر آنزیم ریورس ترانس کریپتاز (M-Mulve RT) ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد و سپس ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه گرمخانه گذاری شد . برای انجام PCR، ۵ میکرولیتر از cDNA تهیه شده با ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس Mastermix 2x (0.08 units / ul taq DNA polymerase, 3mMmgcl2, 0.4mM of each dNTPs) ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای پیش برنده) SVC F (´5TCT ATC ATC AGC TAC ATC GCA TT3´):و معکوس (SVCR2I: CTC TAA ATG AAC AGA ATG GGG TAC IA) و ۱۸ میکرولیتر آب DEPC مخلوط گردید . دستگاه ترموسیکلر با برنامه دمایی ۳ دقیقه در ۹۴ درجه ، ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه ، ۳۰ ثانیه در ۵۴ درجه و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۵ تکرار و در نهایت ۱۰ دقیقه برای ۷۲ درجه انجام گردید .

نتایج

نتایج حاصل از آزمایش RT-PCR بر روی RNA استخراج شده از SVCV با استفاده از محلول IQ2000 , RNX-PLUS RNA EXTRACTION, CINNAPURE RNA و HIGH PURE RNA KIT ROCHE در شکل های زیر نشان داده شده است .همان گونه که در تصاویر مشخص است با استفاده از مخلوط تجاری گوانیدین ایزوتیوسیانات و فنل RNX-PLUS و دو روش ستونی آزمایش RT-PCR مثبت و یک قطعه RNA به bp۴۸۰ خوبی تکثیر یافته است . اما در روش استخراج RNA به روش IQ2000 هیچگونه باندی مشاهده نگردید



نمودار۱: A: کیت ستونی Roche ، B : کیت ستونی سیناژن ، C: کیت IQ2000، D : محلول استخراجRNX -plus ، M : مارکر، N : کنترل منفی

علاوه بر این از نظر کمی نیز بطورکلی میزان RNA تکثیر یافته در نمونه های استخراج شده بر اساس روش ستونی بیش از نمونه های بر پایه فنل – کلروفرم می باشد . بر اساس جذب نوری RNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر میزان RNA استخراج شده با روش ستونی HIGH PURE RNA KIT ROCHE ۳۱/۷۶ میکروگرم بر میکرولیتر بوده است . مقدار RNA بدست آمده از هر پروتکل در جدول ۱ نشان داده شده است .

جدول ۱: غلظت و جذب نوری RNA استخراج شده در چهار کیت جداسازی RNA

روش جداسازی	غلظت RNA (µg/µl) انحراف معیار± میانگین	جذب نوری A260/A280 انحراف معیار± میانگین
RNX-Plus شرکت سیناژن	۸/۵ ± ۳/۴۱	۱/۳۱±./۱۶
RNA Extraction شرکت Iq2000 تایوان	۵/۹ ± ۴/۱۲	۱/۴۴ ± ۰/۱۳
روش ستونی CinnaPure RNA	۱۶/۲۱ ± ۷/۱۲	۱/۴۸ ± ۰/۱۳
High Pure Viral , RNA Kit شرکت Roche روش ستونی	۳۱/۷۶ ± ۱۶/۲۵	۱/۸۸± ۰/۱۱

بحث

تشخیص صحیح و سریع به جهت پیشگیری و دوری جستن از پخش عامل بیماری بخصوص ویروس ها بسیار ضروری است . چندین روش آزمایشگاهی تشخیصی برای بیماری ویرمی بهاره کپور ماهیان (SVCV) وجود دارد ، هر چند که درستی و صحت بعضی از آنها بطور کامل هنوز تایید نشده ولی برای تشخیص ویروس بهاره کپور ماهیان بر طبق نظر OIE یکی از سریع ترین و مطمئن ترین آنها استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز RT-PCR می باشد (OIE,2012) . این روش گرچه در کنار کشت سلول ویروس از روش های بسیار حساس و دارای اعتبار می باشد ولی یکی از جنبه های بسیار مهم این روش بدست آوردن RNA سالم و خالص از بافت یا کشت سلول و پیشگیری از تخریب آن در حین جداسازی به جهت استفاده موثر در روش هایی مثل (reverse transcriptase PCR) RT-PCR و (quantitative reverse transcriptase PCR)qRT-PCR می باشد. با توجه به اینکه اکثر مطالعات بر روی این ویروس بر پایه مولکولی و روش RT-PCR وابسته است ولی تاکنون مطالعه ای جهت انتخاب بهترین روش استخراج RNA این ویروس انجام نشده است. بیشترین تحقیقات انجام شده برای روش های مختلف استخراج RNA در زمینه گیاهان به دلیل دارا بودن ترکیبات پلی ساکاریدی ، پلی فنلی و متابولیت های ثانویه بوده است، زیرا این ترکیبات با اتصال به اسید ریبونوکلئیک باعث ناخالصی و تخریب RNA میگردد (Ye *et al*., 2009 ; Ky *et al*., 2012).

در این تحقیق نتایج RT-PCR نشان دادند که روش های ستونی کیت تجاری Roche و Cinnapure به ترتیب استخراج موثرتر و بیشتر RNA ویروس SVC را در بر داشت. نتایج RT-PCR با میزان RNA استخراج شده با هر یک از این روش ها نیز همخوانی داشت . زیرا بر اساس جذب نوری RNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر ، میزان RNA استخراج شده در روش کیت تجاری Roche، Cinna pure بیشتر از روش های فنل – کلروفرم کیت تجاری IQ2000 و محلول استخراج RNX-PLUS است. برای جداسازی RNA اکثر محققین یا از روش بر پایه کیت های تجاری فنل –کلروفرم (Tao *et al*., 2007 ; Oreshkova *et al*., 1999 ; Hoffman *et a.l*, 2002 ; Lio-Po *et al*., 2009 ; Teng *et al*., 2007; Stone *et al* ., 2003) و یا از کیت های تجاری ستونی (Shivapa *et al*., 2008; Rexhepi *et al*., 2011, Miller , 2007 ; Koutn *et al*., 2003) استفاده کرده اند، ولی هیچگونه مقایسه ای بین این دو روش انجام نشده است با توجه به حساسیت RNA و میزان بالای آنزیم RNase در محیط، دست، مواد آزمایشگاهی سر سمپلر و میکروتیوب ها احتمال تخریب RNA بسیار زیاد است.

از طرفی در روش ستونی طول زمان آزمایش و میزان عملیات برداشت و انتقال مایعات بمراتب کمتر و احتمال خطا و یا آلودگی با اتانل و دیگر مواد کاهش داشت زیرا اتانل خود بعنوان یک عامل تخریب در روش فنل – کلروفرم اثرات سویی بر RNA دارد (Kurar *et al*., 2010; Rosado *et al*., 2007). در اکثر

آزمایشگاه ها که برای تشخیص RNA ویروس ها از روش مولکولی PCR استفاده می شود اولین خطا منفی کاذب در پاسخ آزمایش تخریب RNA بواسطه روش استخراج آن است. Tolosa و همکاران (۲۰۰۷) عنوان نموده اند که استخراج RNA بر پایه ستونی علاوه بر هزینه پایین آن ، دارای خطرات کمتر برای کاربر و همچنین خلوص RNA را در بر دارد. Rosado و همکاران (۲۰۰۷) برای استخراج RNA ویروس های VNNV(Viral Nervous Necrosis Virus) و VHSV(Viral Hemorragic Septicemia Virus) از روش کیت ستونی Roche استفاده نموده و خلوص بالایی از RNA را بدست آورده است. Nour و همکاران (۲۰۱۰) و همچنین Jakovljevic و همکاران (۲۰۱۰) نیز کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با روش کیت ستونی را بهتر از استخراج بر پایه روش های فنل-کلروفرم دانسته، و بخصوص روی خطرات سمی بودن این دو ماده بسیار تاکید نموده اند. Kurar و همکاران (۲۰۱۰) نیز عنوان نموده اند گرچه میزان تولید RNA در روش ستونی نسبت به روش فنل – کلروفرم بیشتر بوده ولی دارای آلودگی با DNA نیز مشاهده کرده است. آنها همچنین زمانی که از DNase در زمان استخراج استفاده کرده اند میزان خلوص بهتری از RNA در روش ستونی مشاهده کرده اند. در این تحقیق نیز میزان خلوص RNA در کیت های ستونی و آلودگی کمتر آن به پروتئین و DNA که با دستگاه نانودراپ اندازه گیری و به مراتب بیشتر از کیت های بر پایه استفاده از روش گوانیدین تیوسیانات و فنل کلروفرم مشاهده گردید. از طرفی در استخراج RNA با روش فنل – کلروفرم تفاوت هایی بین کیت های تجاری وجود دارد که از مهم ترین آن میتوان به اختلاف دماهای مورد استفاده در سانتریفوژ در RNX-PLUS و IQ2000 اشاره کرد . بطورکلی بر اساس مطالعه حاضر می توان نتیجه گرفت که برای استخراج RNA استفاده از روش ستونی از نظر خلوص و میزان تولید بمراتب بهتر از روش های بر پایه فنل – کلروفرم می باشد.

منابع

Ahne, W., Bjorklund, H. V., Essbauer, S., Fijan, N., Kurath, G. and Winton, J. R., 2002. Spring Viraemia Carp (SVC). Diseases of Aquatic Organisms, 52: 261-272

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G. and Struhl, K., 1992. Short protocols in molecular biology. John Wiley and Sons Pub. USA, 4777P.

Chen, Z. Y., Liu, H., Li, Z. Q. and Zhang, Q. Y., 2008. Development and characterization of monoclonal antibodies spring viraemia of carp virus. Veterinary Immunology and Immunpathology, 123: 266-276.

Dixon, P. F., and Longshaw, C. B., 2005. Assessment of commercial test kits for identification of spring viraemia of carp virus. Diseases of Aquatic Organisms, 67: 25-29.

Fijan, N., 1999. Spring viraemia of carp and other viral diseases and agents of warm water fish. pp: 177-244.

Woo, P. T. K., Leatherland, J. F. and Bruno, D. W., 2011. Fish Diseases and Disorders. Vol. 3. CAB books.

FAO, 2012. The state of world fisheries and aquaculture 2012. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome. 197P.

Gaafar, A. Y., Vesley, T., Nakai, T., El-Manakhly, E. M., Soliman, M. K., Soufy, H., Zaki, M. S., Mohamed, S. G., Kenawy, A. .M., El-Neweshy, M. S. and Younes, A., 2011. Histopathological and ultrastructural study of experimental spring viraemia of carp (svc) infection of common carp with comparison between different immunohistodiagnostic techniques efficacy. Life Science Journal, 8(3): 523-533.

Garver, K. A., Dwilow, A. G., Richard, J., Booth, T. F., Beniac, D. R. and Souter, B. W., 2007. First detection and confirmation of spring viraemia of carp virus in common carp, *Cyprinus carpio* L.,

Liu, H., Gao, L. and Shi, X., 2004. Isolation of spring viraemia of carp virus *(*SVCV) from cultured koi (*Cyprinus carpio koi)* and common carp (*C*-carpio carpio*) in PR China*. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists, 24(4): 194–202.

Miller O., 2007. Molecular epidemiology of outbreaks of spring viraemia of carp virus in north America, Europe and Asia .PhD.Thesis North Carolina State University. 140 P.

Nour, M. A., Barbour, E. K., Depint, F., Dooms, M., Niang, K., Dulac, A., Niambu, C. N. and Poillart, P. R., 2010. Comparison of five RNA extraction methods from rabbits blood. Agriculture and Biology Journal of North America, 20: 186-192.

O.I.E. 2012. Manual of Diagnostic tests for Aquatic Animals: Spring Viraemia of carp., pp: 357 – 373

Oreshkova, S. F., Shchelkunov, I. S., Tikunova, N. V., Shchelkunova, T. I., Puzyrev, A. T. and Ilyichev, A. A., 1999. Detection of spring viraemia of carp virus isolates by hybridization with non-radioactive probes and amplification by polymerase chain reaction. Virus Research, 63: 3-10.

Plesko, I. M., Marn, M. V. and Toplack N., 2011. Total RNA extraction method and *Prunus* species influence the detection of *Plum pox potyvirus* by real time RT-PCR. Acta Agriculture Slovenia, 97: 105-113.

Pollard, J. W. and Walker, J, .M., 1990. Animal cell culture. Hummana Press, USA. 713P.

Reschova, S., Pokorova, D., Nevorankova, Z., Holuva, J. and Vesely T., 2007. Detection of spring viraemia of carp virus (SVCV) with monoclonal antibodies. Veterinaria Medicina, 52: 308-316.

Rexhepi, A., Berxholi, K., Scheinert, P., Hamidi, A. and Sherifi, K., 2011. Study of viral diseases in from Hamilton Harbour, Lake Ontario, Canada. Journal of Fish Diseases, 30(11): 665-671.

Goodwin, A. E., 2009. Spring viraemia of carp virus (SVCV): Global status of outbreaks, diagnosis, surveilance and research. The Israeli Journal of Aquaculture, 61(3): 180-187.

Hoffmann, B., Schutze, H. and Mettenleiter, T.C., 2002. Determination of the complete genomic sequence and analysis of the products of the virus of spring viraemia of carp, a fish rhabdovirus . Virus Research, 84: 89-100.

Jakovljevic, K. V., Milena, M. R., Spasic, R., Malisic E. J., Dobicic, J. D., Krivokunca, A. M., Jankovic, R. N., 2010. Comparison of phenol-based and alternative RNA isolation methods for gene expression analysis. Journal of the Serbian Chemical Society. 75(8): 1053-1061.

Koutna, D., Vesely, T., Psikal, I. and Hulova, J., 2003. Identification of spring viraemia of carp virus (SVCV) by combined RT-PCR and nested PCR. Diseases of Aquatic Organisms, 55: 229-235.

Kurar, E., Osman, Ali, M., Guzeloglu, A., Ozsensoy, Y. and Semacan, A., 2010. Comparison of five different RNA isolation methods from equine endometrium for gene transcription analysis . *Kafkas* Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16(5): 851-855.

Ky, H., Yeap, S. P. and Napis, S. B., 2012. The best method for isolated total RNA from durian tissues. International Food Research Journal, 19(3): 1181-1183.

Lio-Po, G., Amar, E., De, la, Pena, L., Orozco, Z. G., Faisan, J., Suarnaba, V. and Belle, Tubo, D., 2009. Surveillance of emerging fish viral pathogens in some southeast Asian countries. The Israeli Iournal of Aquacuclture, 61(3): 208-214.

carpio) in China . Archives of Virology, 152: 1457-1465.

Triant, D. A. and Whitehead, A., 2013. Simultaneous extraction of high-quality RNA and DNA from small tissue samples. Journal of Heredity, 100: 255-260.

Tolosa, J. M., Schjenken, J. E., Civiti, T. D., Clifton, V. L. and Smith, R., 2007. Column-based methods to simultaneously extract DNA, RNA and protein from the same sample. Biotechniques, 43: 799-804.

Vicenova, M., Reschova, S., Pokorova, D., Hulova, J. and Vesely, T., 2011. First detection of Pike-like rhabdovirus in barbell and spring viraemia of carp virus in sturgeon and pike in aquaculture in the Czech Republic. Diseases of Aquatic Organisms, 95(2): 87-95.

Warg, J. V., Dikkeboom, A. L., Goodwin, A. E., Snekvik, K. and Whitney, J., 2007. Comparison of multiple of spring viraemia of carp viruses isolated in the United States. Virus Gene, 53: 87-89.

Way, K., Bark, S. J., Longshaw, C. B., Denham, K. L., Dixon, P. F., Feist, S. W., Gardiner, R., Gubbins, M. J., Le, Deuff, R. M., Martin, P. D., Stone, D. M. and Taylor, G. R., 2003. Isolation of a rhabdovirus during outbreaks of disease in cyprinid fish species at fishery sites in England. Diseases of Aquatic Organisms, 57: 43-50.

Wolf, K.. 1988. Fish viruses and fish viral diseases. Cornell University Press, Ithaca, NY.

Ye, W., Liu, L., Zheng, W., Lin, J. and Yin, J., 2009. Comparison of RNA extraction methods applied to gene cloning of the taxol-producing some freshwater fish in the Republic of Kosovo. *Veterinarski arhiv,* 81(3): 405-441.

Rosado, E. G., Cano, I., Antoniv, B. M., Labella, A., Manchado, M., Alonso, M., Castro, D. and Borrego, J., 2007. Co-Occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured Sparid fish. International Microbiology, 10: 193-198.

Shivappa, R., Kozlowicz, S., Rolland, J., Corsin, F., Way, K. and Levine, J., 2008. Spring viraemia of carp in the United States of America: Evaluation of current diagnostics. Diseases in Asian Aquaculture, 6: 143-156.

Soliman, M. K., Mohamed, S. G., Zaki, M. S. and Saleh, W. D., 2010. First record of a mixed viral infection among cultured common carp in Egypt. Journal of American Science, 6(10): 879-885.

Stone, D. M., Ahne, W., Denham, K. L., Dixon, P. F., Lin, C. T. U., Sheppared, A. M., Taylor, G. R. and Way, K., 2003. Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp virus and pike fry rhabdovirus isolates reveals four gene groups. Diseases of Aquatic Organisms, 53: 203-210.

Svetlana, J., Ivetic, V. and Radosavljevic, V., 2006. *Rhabdovirus carpio* as a causative agent of disease in rainbow trout (*Onchorhynchos mykiss*). Acta Veterinaria, 56 (5-6): 553-558.

Tao, J. J., Gui, J. F. and Zhang, Q. Y., 2007. Isolation and characterization of a rhabdovirus from co-infection of two viruses in mandarin fish. Aquaculture, 262: 1-9.

Teng, Y., Liu, H., Lv, J. Q., Fan, W. H., Zhang, Q. Y. and Qin, Q. W., 2007. Characterization of complete genome sequence of the spring viraemia of carp virus isolated from common carp (*Cyprinus*

fungi. African Journal of Microbiological Research, 3(10): 632-636.

Yue, Z., Teng, Y., Liang, C. , Xie, X., Xu, B., Zhu, L., Lei, Z., He, J., Jiang, Y., Liu, H. and Qin, Q., 2008. Development of a sensitive and quantitative assay for spring viraemia of carp virus based on real-time RT-PCR. Journal of Virological Methods, 152: 43-48.

Zhang, N. Z., Zhang, L. F., Jiang, Y. N., Zhang, T. and Xia, C., 2009. Molecular analysis of spring viraemia of carp virus in China: A fatal aquatic viral disease that might spread in East Asian. Plus One, 4(7): e6337, pp: 1-9.

Comparison of four RNA isolating methods for identification of spring viraemia of carp virus (SVCV)

Mortezaei, S.R.S*; Alishahi, M; Seifi, M. R; Qhasemi, M.

* rmortezaei@yahoo.com

Key words: SVCV, RNA, Extraction, RT-PCR

Received: May 2013 Accepted: September 2013

Abstracts

Spring viraemia of carp virus (SVCV) , a negative sense single stranded RNA virus of the family Rhabdoviridae, is the causative agent of a highly contagious SVC disease that primarily affects the common carp (*Cyprinus carpio*), an economically important fresh water fish species with world-wide distribution.SVCV has also been reported to cause disease in other fishes such as *Poeciliidae, Esocida , Centrarchidae , Siluridae* and *salmonidae* . There are several diagnostic tests for the detection of SVC virus,however, the tests have not been validated. The reverse transcriptase – polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques have been developed and validated representing a powerful tool for detection of RNA. One of the most important aspects isolating RNA is to prevent degradation of the RNA during the isolation procedure. In this study, we explored the efficiency of protocols for RNA isolation from the SVCV strain 56/70.For RNA isolation, we compared four protocols, two guanidine isotiocyanate phenol – chloroform based protocols (RNX – Plus Iran , Iq2000 kit Taiwan) and two column based protocols (Cinnapure RNA Iran , high pure viral RNA kit , Roche Germany) that were commercially available. The results showed that the column based protocols, Roche method and Cinapure performed better than other methods with the yields of 31.76 ng/µl, 16/21 ng/µl, respectively. Each protocol yielded good quality of total RNA bands (480 bp) being observed in agarose gel electrophoreses but was not observed in IQ2000 kit. Amount of total RNA isolated was lower for IQ2000 kit Protocol. Further, the RNA being extracted from SVC by column based protocol method were resulted in successful amplified using RT-PCR method