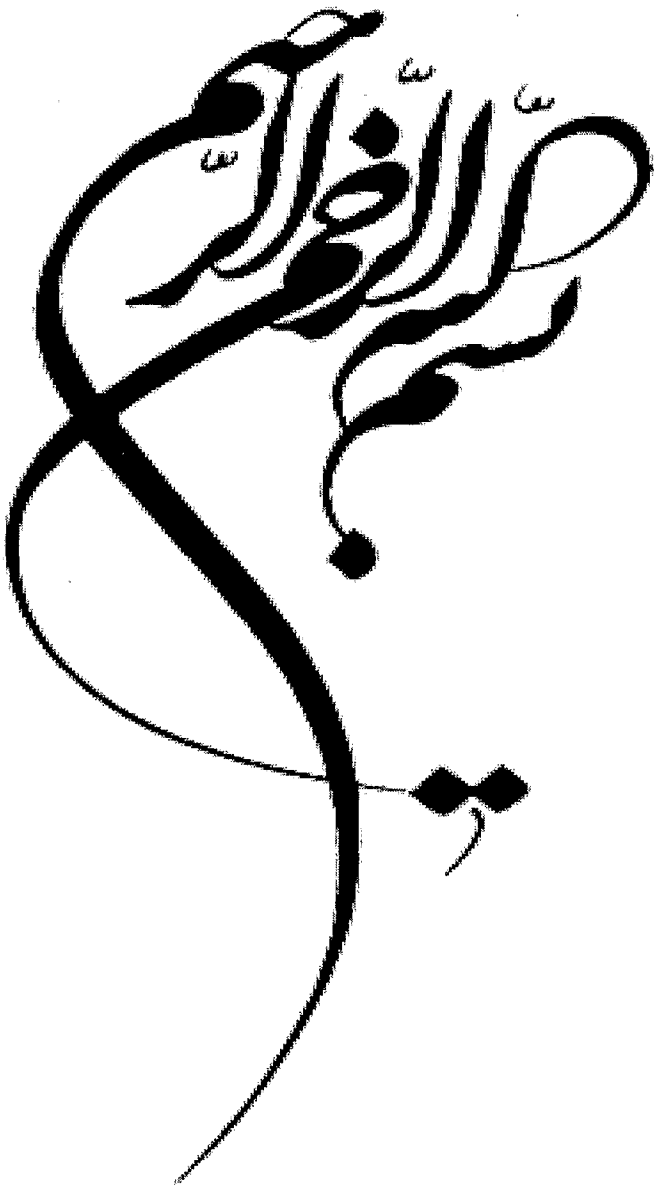


٩٦٤٤٥

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته ویروس شناسی

طراحی روش Nested-PCR برای ردیابی ویرمی و ویروری ویروس BK

نگارش

محمد شناگری

استاد راهنما

دکتر مهرداد روانشاد

استاد مشاور

سید یونس حسینی

۱۳۸۷ /۲/ ۲۸

تابستان ۱۳۸۶

۹۶۴۴۰

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد **محمد شناگری رشتی** رشته: **ویروس شناسی** گرایش:
تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

جناب آقای دکتر مهرداد روانشاد (استاد راهنما)

جناب آقای یونس حسینی (استاد مشاور)

سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی (نماینده تحصیلات‌تکمیلی)

سرکار خانم دکتر حوریه سلیمانجاهی (استادناظر)

جناب آقای دکتر عباس شفیعی (استادناظر)

چکیده

مقدمه:

ویروس BK دارای انتشار جهانی بوده و آنتی بادی بر علیه این ویروس را در اغلب کودکان ۷-۵ ساله می توان ردیابی کرد. عفونت اولیه با این ویروس اغلب بدون علامت بوده و معمولا به یک عفونت نهفته ختم می گردد. عفونت با این ویروس در افراد با ایمنی کامل مشکلی را ایجاد نمی کند اما تضعیف سیستم ایمنی به دنبال پیوند بافت باعث فعال شدن ویروس در برخی افراد و در نهایت ریزش آن در ادرار و در موارد شدید به خون می شود. بیش از ۱۰٪ از افراد دریافت کننده پیوند کلیه می توانند در نهایت BKVN یا نفروپاتی ناشی از ویروس BK را ایجاد نمایند که در ٦۰٪ موارد باعث رد پیوند زودرس خواهد شد. تشخیص به موقع ویروری و ویرمی ویروس می تواند باعث پیش گیری از رد پیوند گردد.

هدف: راه اندازی یک روش حساس Nested-PCR برای شناسایی ویروری و ویرمی ویروس BK

مواد و روش ها:

در این پژوهش تعدادی نمونه ادرار کنترل مثبت و منفی برای راه اندازی روش تهیه شد. پس از استخراج ژنوم با استفاده از سه روش مختلف اقدام به انجام روش PCR بر روی این نمونه ها و بهینه سازی روش در دو راند PCR نمودیم.برای تعیین حساسیت تست از کیت TA vector برای ساخت پلاسمید حاوی قطعه مربوط به راند اول PCR استفاده نمودیم. در مرحله بعد نمونه های ادرار و سرم بیماران پیوندی که حداقل ٦ ماه از زمان پیوند کلیه آنها می گذشت با این تست مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج:

از مجموع ٤۰ بیمار پیوندی که در این پژوهش مورد ارزیابی قرار گرفتند به ترتیب ادرار ۱۸ و سرم ۱۲ بیمار به جهت حضور ویروس BK در آنها مثبت تشخیص داده شد.

نتیجه گیری:

روش Nested-PCR راه اندازی شده نیاز مبرم بالینی به جهت نقش قابل توجه ویروس BK در رد پیوند کلیه می باشد. تست راه اندازی شده در این پژوهش به جهت داشتن حساسیت بالا و قدرت تفکیک عفونت BK از JC یک تست کیفی واجد ارزش در کنترل پس از پیوند بیماران پیوندی است.

واژگان کلیدی: ویروس BK، Nested-PCR، بیماران پیوند کلیه

با نام خداوند

به جاست در این جا از زحمات عزیزانی که مرا در انجام این پژوهش یاری دادند تشکر نمایم.

قبل از همه از خداوند مهربان به جهت لطفی که در قبال این حقیر داشت و مرا در انجام این کار ناقابل بیشتر از هر کسی یاری کرد شکر می گویم. همچنین لازم می دانم از همسرم که رشد و پیشرفت خود را مرهون از خود گذشتگی ها و فداکاری او می دانم در کمال تواضع قدردانی به عمل بیاورم.

از کلیه عزیزانی که با نهایت صمیمیت و صبوری اینجانب را در این مدت چه در کار آزمایشگاهی و چه در کارهای جنبی مساعدت نمودند به خصوص از استاد راهنما جناب آقای **دکتر مهرداد روانشاد** و استاد مشاور جناب آقای **سید یونس حسینی** تشکر می نمایم.

تقدیم به تنها دوست بی توقع... همسرم

و تقدیم به دوست داشتنی ترین امانت خدا... پسرم

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه(۳۷-۲)

عنوان صفحه

۱-۱ مقدمه..... ۲
۱-۲ تاریخچه ٤
۱-۳ طبقه بندی..... ٦
۱-٤ ساختار ویریون ۸
۱-٥ ساختار ژنوم..... ۹
۱-٦ ساختار پروتئین های اصلی ویروس ۱۱
۱-۷ مراحل تکثیر ۱۲
۱-۷-۱ اتصال..... ۱۲
۱-۷-۲ ورود، حمل و نقل داخل سلولی و پوشش برداری ۱۲
۱-۷-۳ رونویسی از ژن های زودرس ۱۳
۱-۷-٤ همانند سازی..... ۱٤
۱-۷-٥ رونویسی از ژن های تاخیری یا دیررس..... ۱۷
۱-۷-٦ سرهم بندی و رهاسازی ویروس ۱۷
۱-۸ ویروس BK و نقش آن در ایجاد تومور..... ۱۹
۱-۹ اپیدمیولوژی ۲۲
۱-۱۰ انتقال ویروس..... ۲۳
۱-۱۱ گسترش ویروس در بدن..... ۲٤
۱-۱۲ تروپیسم سلولی ویروس ۲٤
۱-۱۳ پاتوژنز..... ۲٥
۱-۱٤ نهفتگی ویروس ۲٦
۱-۱٥ تظاهرات بالینی ۲۷
۱-۱٥-۱ ویروس های ایجاد کننده بیماری های کلیوی..... ۲۸

۱-۱۵-۲ ویروس BK و بیماری کلیوی..... ۲۹
۱-۱۵-۳ الگو های هیستولوژیکی..... ۲۹
۱-۱۵-٤ افتراق ما بین BKVN و عفونت سایر ویروس ها..... ۳۱
۱-۱٦ درمان نفروپاتی ناشی از ویروس BK..... ۳۲
۱-۱۷ تشخیص..... ۳۳

فصل دوم: مواد و روشها (۷۳-۳۸)

۲-۱ طرز تهیه محلول های مورد نیاز برای استخراج DNA به روش دستی..... ۳۷
۲-۲ بافر الکتروفورز تریس-بورات- EDTA (TBE-٥X)..... ۳۸
۲-۳ نمونه گیری..... ۳۹
۲-٤ استخراج DNA ویروسی ۳۹
۲-٤-۱ استخراج با استفاده از کیت (QIAamp DNA Blood Mini Kit..... ٤۰
۲-٤-۲ استخراج با استفاده از کیت (QIAamp Viral RNA Mini Kit)..... ٤۲
۲-٤-۳ استخراج به روش دستیNonidet P٤۰, PEG, Boiling ٤۳
۲-٥ Nested-PCR و مزایای آن ٤٤
۲-٦ مواد لازم در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ٤٦
۲-٦-۱ محلول بافری PCR با غلظت ۱۰X..... ٤٦
۲-٦-۲ کلرید منیزیم..... ٤۷
۲-٦-۳ اسیدهای نوکلئوتیدی یا dNTPs ٤۸
۲-٦-٤ آنزیم DNA پلیمراز Taq ٤۸
۲-٦-٥ پرایمر..... ٤۹
۲-۷ طراحی پرایمر..... ٥۰
۲-۸ درجه حرارت مناسب برای اتصال..... ٥۲
۲-۹ محلول ذخیره پرایمر ٥۳
۲-۱۰ دستگاه ترموسایکلر..... ٥۳
۲-۱۱ سایز مارکر..... ٥٤
۲-۱۲ مهارکننده های PCR ٥٥

۲-۱۳ تقویت کننده های PCR ۵۵
۲-۱٤ درجه حرارت دورگه شدن پرایمر ها با DNA الگو ٥٦
۲-۱۵ یون منیزیم ۵۷
۲-۱٦ بافر ۵۸
۲-۱۷ DNA الگو ۵۸
۲-۱۸ تعداد سیکل ۵۹
۲-۱۹ انجام واکنش PCR ٦۰
۲-۲۰ نمایان سازی محصولات PCR بوسیله الکتروفورز در ژل آگارز ٦۲
۲-۲۱ تایید قطعه مربوط به راند دوم با استفاده از هضم آنزیمی ٦۳
۲-۲۲ تعیین حساسیت تست Nested-PCR بهینه سازی شده ٦٤
۲-۲۳ کلون سازی ژن در درون وکتور TA (Blue/white screening) ٦٤

فصل سوم: نتایج(۹٤-۷٤)

۳-۱ طراحی پرایمر ۷۰
۳-۲ انجام PCR بر روی نمونه های control positive و control negative ۷۲
۳-۲-۱ نتایج استخراج با استفاده از کیت (QIAamp DNA Blood Mini Kit) ۷۲
۳-۲-۲ نتایج استخراج به روش دستی Nonidet P٤۰, PEG, Boiling ۷۳
۳-۲-۳ نتایج استخراج با استفاده از کیت (QIAamp Viral RNA Mini Kit ۷۳
۳-۲-٤ مقایسه نتایج PCR با استفاده از سه روش مختلف استخراج ۷٤
۳-۳ نتایج حاصل از بهینه سازی PCR بر روی نمونه شماره ۱ در راند اول ۷۵
۳-۳-۱ نتایج حاصل از گرادیان دمایی در راند اول ۷۵
۳-۳-۲ نتایج حاصل از گرادیان $MgCl_2$ در راند اول ۷٦
۳-۳-۳ نتایج حاصل از گرادیان بافر در راند اول ۷۷
۳-٤ Nested-PCR ۷۸
۳-۵ نتایج حاصل از بهینه سازی PCR بر روی نمونه شماره ۱ در راند دوم ۷۹
۳-۵-۱ نتایج حاصل از گرادیان دمایی در راند دوم ۷۹

۳-۵-۲ نتایج حاصل از گرادیان $MgCl_2$ در راند دوم ۸۰
۳-۵-۳ بهینه سازی تعداد سیکل ۸۱
۳-۵-٤ نتایج حاصل از گرادیان پرایمر در راند دوم ۸۳
۳-٦ نتایج حاصل از هضم آنزیمی بر روی محصول راند دوم ۸٤
۳- ۷ نتیجه حاصل از انجام کلونینگ و استخراج پلاسمید ۸۵
۳-۸ نتیجه حاصل از انجام Colony PCR ۸۵
۳-۹ نتیجه حاصل از انجام Nested-PCR بر روی Serial dilution های مختلف از پلاسمید
برای تعیین حساسیت تست طراحی شده ۸٦
۳-۱۰ نتایج حاصل از انجام Nested-PCR بر روی ٤۰ بیمار دریافت کننده پیوند کلیه ۸۷

فصل چهارم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادها(۱۰۵-۹٦)

٤-۱ بحث و نتیجه گیری ۹۳
٤-۲ پیشنهادها ۹۹

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

ویروسهای BK و JC نخستین بار در سال ۱۹۷۱ از نمونه ادرار یک بیمار دریافت کننده پیوند کلیه جداسازی گردیدند(۱). مطالعات اپیدمیولوژی نشان می دهند که عفونت با این دو ویروس گسترش جهانی داشته و آنتی بادی بر علیه این دو ویروس را در اغلب کودکان ۷-۵ ساله می توان ردیابی کرد(۲). این دو ویروس به صورت مستقل در دوران کودکی افراد راآلوده می کنند که انتقال عمدتا" از طریق تنفسی و گوارشی می باشد(۳). عفونت اولیه با این ویروسها اغلب بدون علامت بوده و معمولا به یک عفونت نهفته ختم می گردد(٤). عفونت نهفته ویروس BK عمدتا" در اپی تلیوم کلیوی-ادراری اتفاق می افتد، در صورتیکه عفونت نهفته ویروس JC در اپی تلیوم کلیوی-ادراری و بافت مغزی دیده می شود(۵). عفونت نهفته ویروس های BK و JC در افراد با سیستم ایمنی کامل اهمیتی ندارد ولی نوسان در سیستم ایمنی (که در حاملگی یا در دریافت کنندگان پیوند به واسطه مصرف داروهای سرکوبگر ایمنی یا افراد مبتلا به ایدز رخ می دهد) بسته به شرایط بیمار یا قدرت داروهای سرکوبگر ایمنی باعث ایجاد viruria (حضور ویروس در ادرار) و در صورت آسیب بافت کلیوی موجب ایجاد viremia (حضور ویروس در خون) خواهد شد(٦). در طی سرکوب ایمنی، تکثیر گسترده ویروس و متعاقب آن ایجاد آسیب های پارانشیم کلیوی موجب نفروپاتی ناشی

از پولیوماویروس[1] می شود(۸). بیش از ۱۰٪ از افراد دریافت کننده پیوند کلیه می توانند در نهایت PVN ایجاد نمایند که باعث رد پیوند زودرس خواهد شد(۹).

مطالعات اخیر نشان داده اند که تشخیص زود هنگام PVN قبل از آسیب های غیر قابل جبران به بافت پیوندی با بهبودی علایم و پاکسازی عفونت در بخش بزرگی از بیماران همراه خواهد بود(۹). ویروس BK عامل اصلی نفروپاتی پولیوماویروسی می باشد در حالیکه ویروس JC بندرت عامل ایجاد نفروپاتی می باشد و اغلب تمایل به ایجاد بیماری در سیستم عصبی مرکزی (CNS) دارد(۱۰). تا کنون چند روش جهت شناسایی و مدیریت این ویروسها ارزیابی شده است که حساس‌ترین و بهترین آنها، روشهای بر اساس PCR می باشند(۹). هر چند اطلاعات اولیه مواردی از دخالت ویروس های BK و JC (۲۳-۲۱ و ۵)در ایجاد PVN را نشان می دهد اما به نظر می رسد اصلی ترین عامل ایجاد PVN به واسطه فعالیت ویروس BK باشد(۱۴،۲۴،۲۵). بدین ترتیب واژه PVN اکثرا" مترادف کلمه BKVN[2] استفاده شده است.

ویروس BK اول بار در سال ۱۹۷۱ از ادرار یک بیمار دریافت کننده پیوند کلیه جداسازی گردید و بعد از آن حروف اول اسم این بیمار به عنوان اسم این ویروس انتخاب گردید. مطالعات اولیه در طی سال های ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰ برای شناسایی مشخصات ویروس انجام شد و مشخص شد که متعلق به خانواده پولیوماویریده است. بر اساس این یافته ها آزمایشات سرولوژیکی راه اندازی شد (۳۷-۳۱) و برای بررسی وضعیت اپیدمیولوژیکی ویروس در جمعیت های مختلف به کار برده شد (۴۳-۳۸) به علاوه ارتباط ما بین ویروس BK و سندرم های کلینیکی خاص از جمله تنگی حالب[3] در دریافت کنندگان پیوندکلیه (۴۴،۴۵) و سیستیت هموراژیک[4] در دریافت کنندگان پیوند

1. Polyomavirus associated Nephropathy (PVN)
2. BK Virus associated Nephropathy
3. Ureteric stenosis
4. hemorrhagic cystitis

سلولهای بنیادی (٤٦،٤٧) مورد بررسی قرار گرفته است. اگرچه ارتباط ما بین ویروس BK و هر یک از این سندرم ها در چندین مطالعه در دهه ۱۹۸۰ یافت شده بود اما این مسئله در اواخر دهه ۱۹۹۰ که در آن زمان این ویروس به عنوان عامل مهاجم در ایجاد PVN در دریافت کنندگان پیوند کلیه شناخته شد، ابعاد مهمتری به خود یافت (۵۲-۳۸و ۲۳و۱۷).

تقریبا ۸۰٪ جمعیت های مختلف واجد آنتی بادی قابل ردیابی ویروس BK می باشند که در اوایل زندگی تولید شده و برای تمام طول عمر باقی می مانند. میزان شیوع ویروری، ویرمی و نفریت ویروس BK پس از پیوند کلیه به ترتیب ۳۰٪ ، ۱۳٪ و ۸٪ تخمین زده می شود.

تشخیص عفونت ویروس بر مبنای تشخیص اثرات سایتوپاتیک ویروس (حضور سلول های Decoy به عنوان مارکر درادرار)، ردیابی ویروس (در خون، ادرارو بافت کلیه)، ایمنی بر علیه ویروس (آنتی بادی ضد ویروس) و یافته های بافت شناختی نفریت کلیوی انجام می گیرد. اثبات ویرمی ویروس BK به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) یک تست قابل اعتماد برای تشخیص نفریت ویروس BK می باشد. همچنانکه در قریب به ۱۰۰٪ موارد مشاهده شده است .ویروری در ٤٠-۳۰٪ موارد دریافت کننده پیوند مشاهده می شود و مقدار ویروس در ادرار صد ها برابر مقدار ویروس در خون است(١٤).

۱-۲- تاریخچه

تاریخچه تحقیق در مورد پولیوماویروس به دهه ۱۹۵۰ باز می گردد. در یک سری مطالعات بر روی MLV[1] مشاهده شد که در صورت پاساژ ویروس در بین موشها در برخی موارد، دریافت کنندگان ویروس به جای لوکمی، مبتلا به تومور غدد بزاقی یا پاروتید گشتند. این قضیه به عامل پاروتیدی نسبت داده شد و ثابت شد که این عامل به لحاظ خصوصیاتی چون سدیمانتاسیون،

1. Murine Leukemia Virus

فیلتراسیون و مقاومت به گرما با ویروس لوکمی موش تفاوت دارد. استوارت[1] متوجه تشکیل چندین نوع تومور در نوزادان موش پس از تلقیح این عامل شد و واژه polyomavirus که برگرفته از واژه های یونانی Poly به معنی چندین و oma که علامت سرطان می باشد را ابداع کرد. یک مشاهده اولیه مهم و جالب این بود که ویروس عفونی از بافت توموری قابل جداسازی نبود ولی از خود حیوان می شد جداسازی کرد. عضو بعدی این خانواده که شناسایی شد، SV40[2] بود که در سال ۱۹۶۰ توسط سوویت[3] و هیلمن[4] کشف شد. این محققان در حال غربالگری واکسن های پولیوی تولید شده در کلیه میمون رزوس از حیث وجود ویروس های آلوده کننده بودند و زمانی که سلول کلیه میمون آفریقایی جهت رشد ویروس استفاده کردند SV40 جداسازی گردید (باید توجه کرد که این ویروس در سلول های کلیه میمون رزوس اثرات سایتوپاتیک ایجاد نمی کند). از آن زمان تا کنون یک سری از پولیوماویروس های مهم دیگر از پستانداران و پرندگان گوناگون جداسازی گردیده اند. دو پولیوماویروس انسانی شناخته شده تا کنون یعنی BKV[5] و JCV[6] نامگذاریشان بر گرفته از حروف اول اسامی بیمارانی است که نخستین بار در سال ۱۹۷۱ از آنها جداسازی شدند. ویروس JC توسط پدگت[7] و همکارانش با انتقال از بافت مغزی بیمار مبتلا به سرطان هوچکین با بیماری لوکوانسفالوپاتی پیشرونده چند کانونی[8] به کشت سلول های مغز جنین انسان جداسازی گردید. ویروس BK توسط گاردنر[9] و همکارانش پس از تلقیح ادرار یک بیمار دریافت کننده پیوند کلیه به سلول های کلیه میمون آفریقایی جداسازی گردید. بر مبنای مطالعات سرو اپیدمیولوژیکی این دو

1. Stewart
2. Simian virus 40
3. Sweet
4. Hilleman
5. BK Virus
6. JC Virus
7. Padgett
8. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy(PML)
9. Gardner

ویروس در اغلب جوامع بشری از شیوع بالایی برخوردار می باشند. آنها می توانند عفونت های پایدار و تحت حاد را در اشخاص سالم ایجاد نمایند و سپس در شرایط نقص ایمنی مجددا" فعال گردند.

برای سالها پولیوماویروس ها به عنوان مدل برای درک فرآیندهای سلول یوکاریوتی از قبیل رونویسی همانندسازی، ویرایش و ترانسفورماسیون انکوژنیک استفاده می شدند. توجه به پولیوماویروس ها به عنوان پاتوژن های انسانی مطالعات بیولوژیکی صرف را کنار زد. البته باید در نظر گرفت که این ویروس ها سالها به دلیل عدم شناخت کافی از وضعیت بیماریزایی شان به لحاظ بررسی های اتیولوژیکی در حاشیه قرار داشتند. ظهور ویروس HIV منجر به افزایش شدید PML وابسته به ویروس JC شد همچنین استفاده از رژیم های جدید دارو های سرکوب کننده ایمنی افزایش قابل توجه بیماری های مرتبط با ویروس BK را به همراه داشت. در این قسمت توجه بیشتری نسبت به ویروس BK با توجه به عنوان پایان نامه خواهد شد.

۱-۳- طبقه بندی

در ابتدا پولیوماویروس ها به عنوان یک جنس از خانواده پاپواویریده در کنار پاپیلوماویروس ها طبقه بندی شده بودند. در سال ۲۰۰۰، کمیته بین المللی طبقه بندی ویروس ها[1] این ویروس ها را در دو گروه مجزای پولیوماویریده و پاپیلوماویریده طبقه بندی کردند. جدول ۱-۱ اعضای خانواده پولیوماویریده، جنس پولیوماویروس را نشان می دهد. اعضای جنس پولیوماویروس خصوصیات فیزیکی و بیولوژیکی را دارند که آنها را در خانواده پولیوماویریده قرار می دهد. این ویروس های واجد ژنوم DNA در سلول های میزبان اصلی خود به صورت کارآمد تکثیر کرده و منجر به مرگ سلولی می شوند. در سایر گونه ها بسیاری از پولیوماویروس ها توانایی تکثیر ندارند، و تنها

1. International Committee on the Taxonomy of Viruses

محصولات ژنهای اولیه را تولید می کنند و ممکن است موجب عفونت ترنسفورمینگ[1] یا انکوژنیک[2] گردند. این ویروس ها طیف سلولی محدودی را آلوده می کنند.

Host	Virus	Characteristics
Human	BK virus (BKV)	Common infection of childhood; persists in kidney epithelium and possibly lymphocytes
	JC virus (JCV)	Common infection of childhood; persists in kidney epithelium, lymphocytes, and bone marrow; produces PML in immuno-compromised hosts
Monkey[a]	Simian virus 40 (SV40)	Natural infection of macaques in Asia; persists in kidney; produces PML-like disease in immunocompromised macaques
	Simian agent 12 (SA12)	Natural infection of baboons in Africa
	Lymphotrophic papovavirus (LPV)	Virus of African green monkey; multiplies in B lymphoblasts
Cattle	Bovine polyoma virus (BPyV)	Common infection of cattle; probably persists in kidney
Rabbit	Rabbit kidney vacuolating virus (RKV)	Infection of cottontail rabbits
Mouse	Mouse polyoma virus (MPyV)	Natural infection of mice in wild; may infect laboratory mouse colonies; persists in kidney
	K virus	Natural infection of mice; infects lung endothelium
Hamster	Hamster papovavirus (HaPyV)	Produces cutaneous tumors in hamsters
Athymic rat	Rat polyomavirus	Affects parotid gland
Parakeet	Budgerigar fledgling disease virus (BFDV)	Produces acute fatal illness in fledgling budgerigars

جدول ۱-۱ اعضای خانواده پولیوماویریده

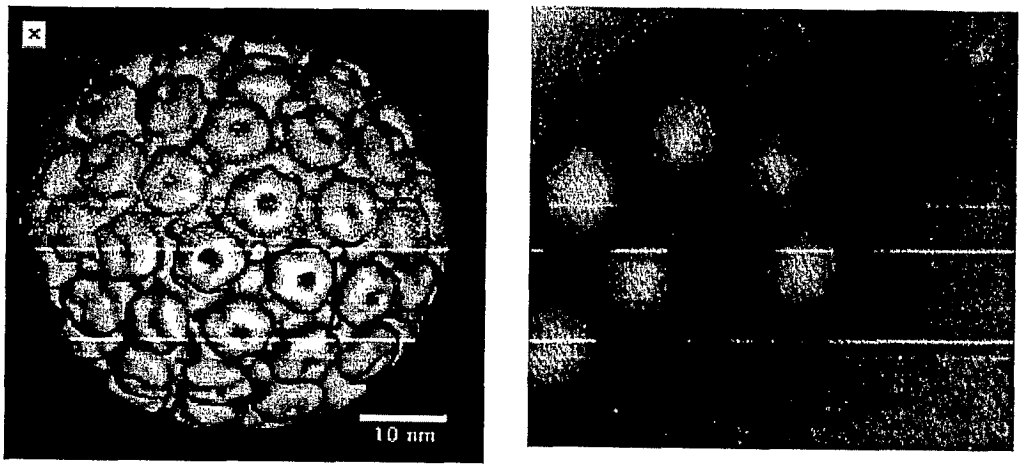
1. Transforming
2. Oncogenic

۱-٤- ساختار ویریون

پولیوماویروس ها فاقد انولوپ با اندازه 40-45 nm بوده که کپسید آنها واجد ۳ پروتئین VP1,VP2,VP3 می باشند. ژنوم آنها DNA دورشته ای است که از انتها ها به صورت کووالان به هم متصل بوده و هیستونهای سلولی H3, H2B, H2A و H4 را با خود همراه دارند. دو خصوصیت آخر باعث تشکیل یک مینی کروموزوم ویروسی می گردد که ساختار یکسانی را همانند کروماتین سلولی به نمایش می گذارد. تنها تفاوت، عدم حضور هیستون H1 است که تنها زمانی که ویروس در داخل سلول عفونی وارد شد با ژنوم همراه می گردد. ذرات دارای یک تقارن بیست وجهی T=7 هستند و در شیب چگالی 240S سوکروز رسوب می کنند. ویریونهای بالغ واجد چگالی 1.34g/mL بوده اما چگالی کپسید های تو خالی 1.29g/mL می باشد. این ویروس ها به گرما وغیر فعالسازی توسط فرمالین تا حدودی مقاومند. با توجه به نبود انولوپ در آنها مقاومت به حلال های چربی قابل پیش بینی است. کپسید از ۷۲ پنتامر تشکیل یافته که هر پنتامر شامل پنج مولکول VP1 و یک مولکول از VP2 یا VP3 می باشد. پایداری در اتصال کپسومر ها به یکدیگر به دلیل حضور یونهای کلسیم می باشد و جهش در اسید آمینه های مسئول اتصال به یون کلسیم باعث از هم گسیختگی قبل از بلوغ ویروس خواهد شد. تیمار ویروس با EGTA تحت شرایط احیا باعث جدایی ساختار کپسید و تولید پنتامر های VP1 خواهد شد. تغییرات پس از ترجمه ای که تا به حال گزارش شده اند شامل دو تغییر می باشد : یک باند دی سولفیدی ما بین کپسومر های پنتامریک و یک میریستیلاسیون[1] در انتهای N - ترمینال VP2. از بین پروتئین های حاضر در کپسید تنها VP2 در سطح قرار می گیرد. همانند اکثر ویروس ها تکثیر در پولیوما ویروس ها همراه با تولید ذرات با تیپ های متفاوت می باشد، یعنی علاوه بر ویریون بالغ، کپسید های تو خالی و کپسید های واجد

1. myristylation

DNA سلولی به جای DNA ویروسی تولید می شوند. شکل ۱-۱ ساختار میکروسکوپ الکترونی و شماتیک ویروس BK را نشان می دهد.



شکل ۱-۱: ساختار ویروس BK

۱-۵- ساختار ژنوم

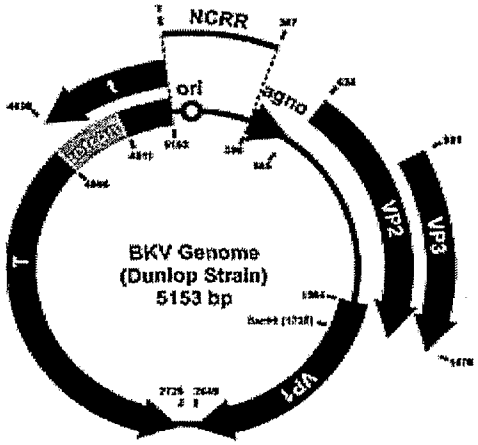
ژنوم پولیوما ویروس ها حدودا 5Kbp می باشد که در مورد ویروس BK این عدد به 5.3Kbp می رسد(۱۳) و ژنهای تنظیمی، زودرس و دیررس را رمزگذاری می کند. ناحیه تنظیمی بعضا" با عنوان ناحیه کنترل غیر کد کننده[1] (NCCR) یاد می شود. نواحی زودرس و دیررس در سکانس های رمزکننده خود با یکدیگر همپوشانی ندارند و از دو رشته مختلف DNA و در جهات مخالف رمزگذاری می گردند.

پروموتورهای زودرس و دیررس در ناحیه تنظیمی بوده و با یکدیگر و نیز با ناحیه آغاز همانندسازی همپوشانی دارند. رونویسی زودرس از پروموتور زودرس آغاز شده و در یک جهت ادامه می یابد. mRNA های زودرس پس از تشکیل دم پلی A و حذف اینترون ها شکل می گیرند. هر یک از پولیوماویروس ها حداقل دو mRNA زودرس را با اسپلایسینگ متفاوت تولید می کنند،

1. Noncoding Control Region

که به آنتی ژنهای T بزرگ و t کوچک ترجمه می گردند. ویروس های MPyV و HaPyV همچنین یک mRNA سوم نیز تولید می کنند که مسئول ساخت آنتی ژن T متوسط یا middle می باشد. ویروس BK علاوه بر آنتی ژن T بزرگ و t کوچک یک آنتی ژن دیگر با نام آنتی ژن T مینی[1] تولید می کند.

mRNA های ویروسی که رمز گذاری ۳ پروتئین کپسید یعنی VP2, VP1و VP3 و همچنین پروتئین چهارمی با نام Agnoprotein را انجام می دهند از رشته دیگر DNA دو رشته ای و در جهت مخالف با ژن های زودرس رونوشت برداری می گردند. همانند mRNA های زودرس mRNA های دیررس نیز واجد دم پلیA در انتها بوده و عمل اسپلایسینگ برای تولید پروتئنهای مختلف نیز بر روی آنها انجام می گیرد. در این مورد یکی از mRNA ها باعث تولید VP1 می شود ولی دیگری یا VP2 و یا VP3 را تولید خواهد کرد. به طوریکه ORF[2] مربوط به VP3 در انتهای 3′ mRNA مربوط به VP2 جای گرفته است. آگنوپروتئین در مراحل انتهایی چرخه تکثیر ویروس نقش دارد. شکل ۱-۱ سازماندهی ژنوم ویروس BK را نشان می دهد.



شکل ۲-۱ ساختار ژنوم ویروس BK

1. mini T Antigen
2. Open Reading Frame