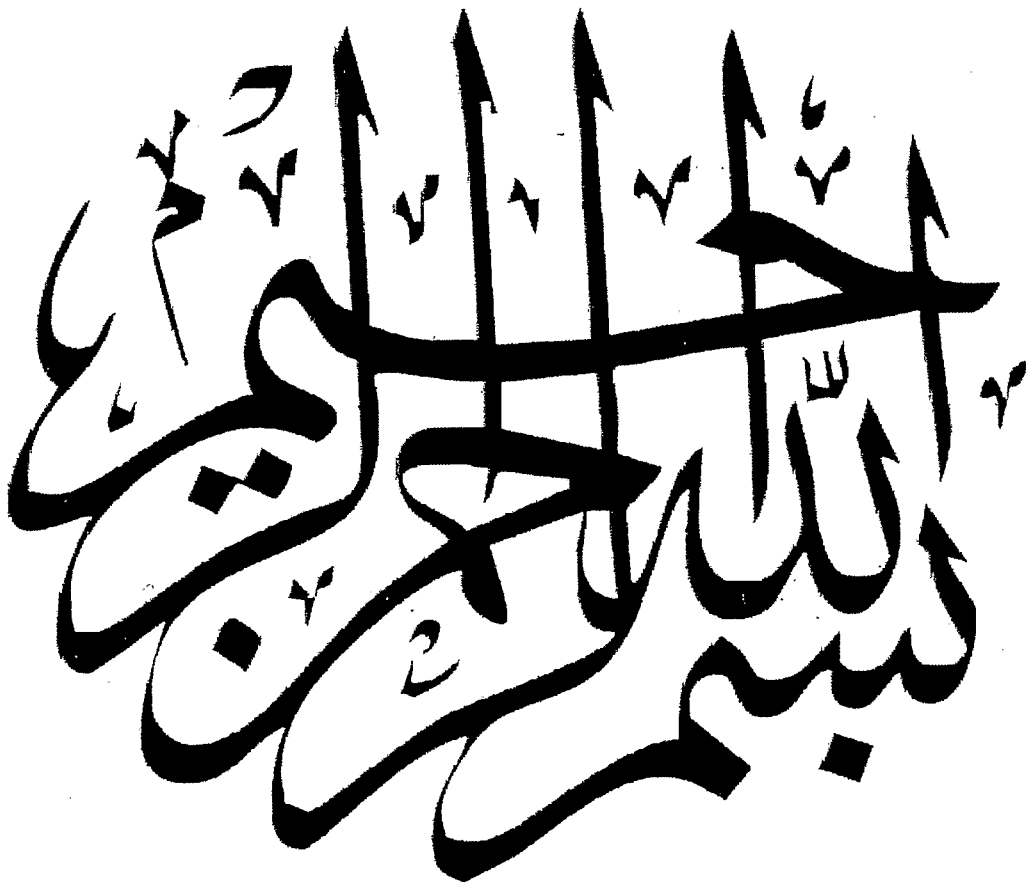
٨٧/١/١٠٠٠١٨
٨٧,٩,٢٠



١٠٣٤٩٩

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی

تشخیص همزمان ویروس HIV-1 و ویروس HCV بااستفاده از تکنیک Real-Time NASBA

نگارش:
مهدی پریان نوغانی

استاد راهنما:
دکتر مهدی فروزنده مقدم

استاد مشاور:
دکتر فرزانه صباحی

زمستان ۸۶

۱۳۸۷/۹/۱۲

۱۰۲۰۴۹۹

فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد **آقای مهدی پریان نوغانی** رشته: **بیوتکنولوژی پزشکی** 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 مهدی فروزنده مقدم (استاد راهنما)

سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی (استاد مشاور)

جناب آقای دکتر محمد جواد رسایی (نماینده تحصیلات‌تکمیلی)

جناب آقای دکتر بهرام کاظمی (استادناظر)

سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری زاده (استادناظر)

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی که با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه‌ها / رساله‌های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره‌برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین‌نامه‌ها و دستورالعمل‌های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما مسئول مکاتبات مقاله باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

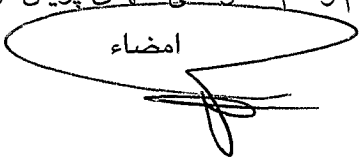
ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و بر اساس آئین نامه های مصوب انجام می‌شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری می شود.

نام و نام خانوادگی: مهدی پریان نوغانی

امضاء



آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس ، مبین بخشی از فعالیتهای علمی- پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱ : در صورت اقدام به چاپ پایان نامه(رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به (دفتر نشر آثار علمی) دانشگاه اطلاع دهد.

ماده۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

کتاب حاضر،حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته بیوتکنولوژی پزشکی است که‌درسا ل ۸۷ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم و مشاوره سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی و جناب آقای دکتر حسین تهرانی از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه ، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به دفتر (نشر آثار علمی) دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده۳ ،۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده رابه عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدر س، تأدیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسار ت، دانشگاه می تواندخسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فرو ش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب مهدی پریان نوغانی دانشجوی رشته بیوتکنولوژی پزشکی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: مهدی پریان نوغانی

تاریخ و امضا: ۸۷/۱۲/۲۰

اگر قابل تقدیم باشد

ابتدا به رسم ادب تقدیم می کنم به سرور ادب عالم حضرت عباس ابن علی (ع)

وآنگاه تقدیم به:

روح پاک پدرم که درس ایثار داد

مادرم

سخن گفتن از مادر و یافتن کلماتی برای سپاس از زحمات او چه سخت است و چه میتوان گفت و نوشت تا خود و او راضی بود چه کلمات سبز و سرخی را می توان بر سینه سفید کاغذ نغزاند تا احساس درونی مان را از اینهمه مهر و محبت مادر نشان دهد.

مادر... او که نسبت به دیگران دریایی از عشق است. کسی که قلب او مثل دشت وسیع و نگاهش به پاکی همه آبهای زلال دنیاست. کسی که در زندگی تلخی ها می چشد اما تلخی نمی کند. او که در برابر سختیها همیشه استوار و صبور است.

مادر که همیشه چشم امیدم به خدا و دعاهای نیمه شب تو بوده است. و در تمام مراحل زندگی و تحصیل پندها و لبخندهای گرمت روشنی بخش راهم بوده است.

تا ابد بمان... تا دست های پر مهرت را چون همیشه عصایی بسازم و با آن راه پر پیچ و خم زندگی را بپیمایم.

مادر سپاس از تمام غمها و لبخندهایت

تقدیم به:

برادران و خواهر گرامیم

که همواره در طول مدت تحصیل دلسوزانه مشوق من بوده اند.

رضایتشان همه آرزوی من است.

سپاسگزاری

اثر پیش روی، آموخته هایی در حد بضاعت ناچیز نگارنده، از دریای بیکران ولی نعمتان بیشمار است؛ که هر چند از فرط کثرت، ذکر نامشان مقدور نیست، لیک طلایه دارانشان را از فرط حدت نقش شان، یارای گریز از حمد نمی باشد:

جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم

سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی

جناب آقای دکتر حسین تهرانی

گرانمایگانی که این شاگرد کوچک، خود را وامدارشان می بیند و سپاس الطافشان را فرض می گیرد.

همچنین از اساتید محترم گروه بیوتکنولوژی پزشکی جناب آقای دکتر رسایی، دکتر سرکار خانم دکتر رهبری زاده‌کمال تشکر را دارم.

و نیز از جناب آقای عباسعلی راز ، آقای وحیدکیا ، آقای دکتر سمیعی ، آقای حمید آقایی، آقای محمود نادری،خانم رمضانی ، خانم دکتر رجبی و آقای محمد قربانی و تمام همکلاسیهای عزیزم و دانشجویان گروه بیوتکنولوژی پزشکی و جناب آقای کروندیان تشکر و قدردانی می کنم. توفیق بدرقه راهشان باد.

چکیده:

عفونت با ویروس های HIV-1 و HCV ، بخصوص در حالت co-infection از مشکلات بالینی قابل توجه در بیماران مصرف کننده فراورده های خونی می باشد.بنابراین اطمینان از سلامت فراورده های خونی به منظور پیشگیری از شیوع آنها از اهمیت بالایی برخوردار است.عفونت همزمان دو ویروس HIV-1 و HCV در اروپا و امریکا نسبتا شایع بوده و میزان شیوع آن در این مناطق به ترتیب ۲۵٪ و ۱۰٪ می باشد.از راهکارهای قابل توجه آزمایش های سرولوژیکی حساس برای غربالگری آنتی بادی های تولید شده علیه HIV-1 و HCV را می توان اشاره کرد. عفونت HIV-1 و HCV ممکن است در دوره پنجره (window) انتقال پیدا کنند ، که در این مرحله عفونت با تستهای سرولوژیکی قابل تشخیص نمی باشند. برای فایق آمدن به این مشکلات ،روشی تحت عنوان Multiplex NASBA Real-Time برای تشخیص چند ویروس به صورت همزمان توسعه یافت. NASBA یک روش تکثیر RNA در شرایط هم دما می باشد.روشهای آشکار سازی RNA وقت گیر و همچنین وجود خطر آلودگی می باشد. این اشکالها می تواند بوسیله تکنیک NASBA Real-Time بر طرف شود.برای این منظور از Molecular Beacon برای آشکار سازی RNA دو ویروس HIV-1 و HCV استفاده شد. Molecular Beacon یک توالی اولیگو نوکلئوتیدی تک رشته است که دارای ساختار حلقه و لوپ است. توالی لوپ مکمل توالی هدف می باشد وتوالی ساقه که در دو انتهای لوپ می باشد مکمل هم می باشد.یک ماده فلوروفور دریک انتهای ساقه ودر سردیگر یک ماده خاموشگر بصورت کووالانتی اتصال دارند.وقتی Molecular Beacon در محلول بصورت آزاد وجود دارد قسمت ساقه به لوپ اتصال دارد وفلورسا نس از ماده فلوروفور به ماده خاموشگر منتقل می شود که آنرا بصورت انرژی آزاد می کند.وقتی توالی لوپ مکمل خود را پیدا کند ماده فلوروفور از ماده خاموشگرجدا شده وطی تغییرات فضایی که در ماده فلوروفور ایجاد می شود دیگر ماده خاموشگر نمی تواند آنرا خاموش کند و ماده فلوروفور انرژیی را که باعث بر انگیختگی اش شده ، در طول موج بالاتر رها می کند. پروبهای خطی درمقایسه با پروبهای دارای ساختار لوپ وحلقه از اختصاصیت پایین تری برخوردارند که این موضوع را به عدم وجود ساقه دراین پروبها نسبت می دهند.در واکنشهایی که بصورت همزمان چندین توالی مورد هدف قرار می گیرد، ما می توانیم از چندین پروب Molecular beacon که دارای فلوروفور مختلف می باشند استفاده کنیم.فلوروفورهای مختلف بصورت همزمان می توانند در یک واکنش برانگیخته شده وتوسط فیلترهای نشری آشکار سازی صورت گیرد.استفاده همزمان دوMolecular beacon با فلوروفورهای مختلف در سیستم NASBA بوسیله ما شرح داده شد.هدف از این تحقیق توسعه سیستم Multiplex NASBA بود. Multiplex NASBA یک روش بسیار اختصاصی همراه با

حساسیت بالا می باشد.تکنیکMultiplex NASBA Real-time ، که در یک تیوب انجام می شود برای آشکار سازی دو ویروس HIV-1 و HCV مورد استفاده قرار گرفت.

بدون شک روش حاضر یک روش سریع،ارزان،حساس،مناسب ،هم دما برای غربا لگری نمونه های دهندگان خون از نظر عفونت همزمان HIV-1 و HCV می باشد.

واژگان کلیدی: آشکار سازی دو ویروس HIV-1 وHCV ،تشخیص همزمان HIV-1 وHCV بوسیله تکنیک Multiplex NASBA Real-time ، عفونت همزمان دو ویروس HIV-1 وHCV

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه
فصل ۱ مقدمه ۱
۱-۱- ویروس نارسایی ایمنی انسانی (HIV) ۲
۱-۱-۱- تاریخچه ۲
۱-۱-۲- همانند سازی HIV ۳
۱-۱-۳- اپیدمیولوژی ۵
۱-۲- هپاتیت C ۱۱
۱-۲-۱- تاریخچه ۱۱
۱-۲-۲- اپیدمیولوژی ۱۲
۱-۳- عفونت همزمان HIV-1/HCV : ۱۴
۱-۳-۱- روش های تشخیصی ۱۴
فصل ۲ مروری بر مطالعات انجام شده ۱۷
۲-۱- روشهای تشخیصی بر پایه اتصال آنتی ژن به آنتی بادی ۱۸
۲-۱-۱- الایزا Enzyme Linked Immunosorbent assay (ELISA) ۱۸
۲-۱-۲- ایمونوبلات (Immuno Blotting) ۱۹
۲-۲- مروری بر روشهای تشخیص مولکولی ۲۰
۲-۲-۱- هیبریداسیون اسید های نوکلئیک ۲۱
۲-۲-۲- توالی یابی اسید های نوکلئیک ۲۱
۲-۲-۳- تکثیر اسید های نوکلئیک ۲۱
۲-۲-۳-۱- روشهای تکثیر وابسته به سیکلهای دمایی ۲۱
۲-۲-۳-۱-۱- RT-PCR ۲۲
۲-۲-۳-۱-۲- Multiplex –RT-PCR ۲۲
۲-۲-۳-۲- روشهای هم دما ۲۲
۲-۲-۳-۲-۱- SMART ۲۳
۲-۲-۳-۲-۲- RT-SDA ۲۴
۲-۲-۳-۲-۳- LAMP ۲۵
۲-۲-۳-۲-۴- bDNA ۲۵
۲-۲-۳-۳- HDA ۲۷
۲-۲-۳-۳-۲- NASBA ۲۷
۲-۳- روشهای آشکار سازی و شناسایی ۲۹
۲-۳-۱- آگاروز ژل الکتروفورز ۲۹
۲-۳-۲- آشکار سازی بر پایه ساختار لیپوزومی ۲۹
۲-۳-۳- آشکار سازی بر پایه کروماتوگرافی الیگونوکلئوتیدها ۳۰

۲-۳-۴-ELISA ۳۱
۲-۳-۵-ElectroChemiluminesence (ECL) ۳۲
۲-۳-۶-NASBA Real-Time ۳۲
۲-۴- روش های آشکار سازی در Real –Time ۳۳
۲-۴-۱- استفاده از رنگهای فلوروسنت ۳۳
۲-۴-۱-۲- گروه یک ۳۳
۲-۴-۱-۳- گروه دوم ۳۴
۲-۴-۱-۴- گروه سوم ۳۴
۲-۴-۲- استفاده از پروبهای اختصاصی ۳۴
۲-۴-۲-۱-5' Nuclease Probes ۳۵
۲-۴-۲-۲-Adjucent hybridization Probes ۳۵
۲-۴-۲-۳-Hairpin Probes ۳۶
۲-۴-۲-۴-Light-up Probes ۳۷
۲-۴-۲-۵-Sunrise Primers ۳۸
۲-۴-۲-۶-Lux Primers ۳۸
۲-۵- تجزیه و تحلیل اطلاعات کمی ۳۹
۲-۵-۱- تعیین کمیت مطلق ۳۹
۲-۵-۲- تعیین کمیت نسبی ۳۹
فصل ۳ مواد و روشها ۴۰
۳-۱- مواد و روشها ۴۱
۳-۱-۱- بررسی توالی های ژنوم ویروس HIV-1 و HCV جهت انتخاب توالیهای مناسب برای طراحی پرایمر و پروب ۴۱
۳-۱-۱-۱- نکات مهم در طراحی پرایمرهای NASBA ۴۱
۳-۱-۱-۲- نکات مهم در طراحی پروب های NASBA ۴۱
۳-۱-۱-۳- طراحی Molecular Beacon ۴۲
۳-۱-۲- استخراج RNA از ژنوم ویروس HIV-1 و HCV ۴۳
۳-۱-۳- انجام واکنش رونوشت برداری معکوس بر روی RNA ژنوم HIV-1 و HCV ۴۳
۳-۱-۴- انجام واکنش PCR و بهینه سازی آن بر روی cDNA ی تهیه شده از دو ویروس ۴۳
۳-۱-۴-۲- آشکار سازی محصولات PCR با آگاروزژل الکتروفورز ۴۴
۳-۱-۴-۳- جدا سازی و تخلیص محصولات PCR از ژل آگاروز ۴۴
۳-۱-۴-۴- انجام کلونینگ بر روی قطعات بدست آمده از ژنوم دو ویروس ۴۵
۳-۱-۴-۵- انجام واکنش Colony PCR برای تأیید ورود قطعات ژنوم ویروسها ۴۵
۳-۱-۴-۶- تخلیص پلاسمید از باکتری ترانسفورمه ۴۶
۳-۱-۴-۷- آشکار سازی محصولات استخراج شده (پلاسمید) با آگاروز ژل الکتروفورز ۴۶
۳-۱-۴-۸- بررسی نتایج بدست آمده از توالی یابی ۴۶

۳-۱-۴-۹- تهیه استوک از باکتریهای ترانسفورمه شده بـه عنـوان نمونـه کنتـرل مثبـت و بهینـه سازی واکنش NASBA , PCR ۴۶
۳-۱-۵- انجام واکنش Multiplex PCR بر روی پلاسمیدهای حاوی قطعات موردنظرازدو ویروس ۴۷
۳-۱-۶- انجام واکنش Real-time PCR با استفاده از SYBER GreenI (SG) ۴۷
۳-۱-۶-۱- بهینه سازی غلظت SYBER Green I ۴۷
۳-۱-۶-۲- استفاده از SYBER Green I ۴۸
۳-۱-۷- انجـام واکـنش Multiplex Real-Time PCR بـا اسـتفاده از SYBER Green I و تفکیـک قطعات ژنوم ویروسها با استفاده از Melting Curve ۴۹
۳-۱-۸- انجام واکنش PCR با استفاده از پروب Molecular Beacon ۵۰
۳-۱-۸-۱- بهینه سازی غلظت پروب و پرایمر ۵۱
۳-۱-۹- ساخت یک RNA مطمئن به عنوان کنترل مثبت (با غلظت بالا) برای واکنش NASBA ۵۱
۳-۱-۹-۱- قرار گرفتن تمام محصول PCR بر روی ژل آگاروز والکتروفورز ۵۲
۳-۱-۹-۲- بریدن و جداسازی قطعه مورد نظر از روی ژل و تخلیص DNA ۵۲
۳-۱-۹-۳- ورود محصول PCR در فرآیند رونویسی در شرایط آزمایشگاه ۵۲
۳-۱-۹-۴- زدودن DNA از RNA تولید شده در فرآیند رونویسی ۵۲
۳-۱-۹-۵- حذف آنزیم DNase I ۵۲
۳-۱-۹-۶- تخلیص RNA رونویسی شده با استفاده از Trizol ۵۳
۳-۱-۹-۷- انجام واکنش PCR بر روی RNA ی رونویسی شده ۵۳
۳-۱-۱۰- نحوه زدودن RNase از محیط در آگاروز ژل الکتروفورز ۵۳
۳-۱-۱۰-۱- زدودن RNase از ظروف شیشه ای ۵۳
۳-۱-۱۰-۲- زدودن RNase از ظروف فلزی ۵۳
۳-۱-۱۰-۳- تهیه بافرهای عاری از RNase ۵۳
۳-۱-۱۰-۴- تهیه آب و محلولهای عاری از RNase با استفاده از DEPC ۵۳
۳-۱-۱۱- انجام واکنش NASBA ۵۴
۳-۱-۱۱-۱- ایجاد شرایط بهینه برای فرآیند NASBA ۵۴
۳-۱-۱۱-۲- تأثیر غلظت پرایمر ۵۴
۳-۱-۱۱-۳- تأثیر DMSO بر واکنش NASBA ۵۵
۳-۱-۱۱-۴- بررسی اثر آنزیم RNase H در واکنش NASBA ۵۵
۳-۱-۱۱-۵- انجام واکنش Multiplex NASBA بر روی ژنوم دو ویروس HCV/HIV-1 ..... ۵۵
۳-۱-۱۱-۶- بررسی محصولات NASBA بر روی آگاروز ژل الکتروفورز ۵۶
۳-۱-۱۲- انجام واکنش NASBA با استفاده از پروب Molecular Beacon ۵۶
۳-۱-۱۲-۱- بهینه سازی غلظت پروب ۵۶
۳-۱-۱۲-۲- بهینه سازی غلظت DMSO ۵۶
۳-۱-۱۲-۳- انجام واکنش Multiplex NASBA با استفاده از پروب Molecular Beacon ۵۷
فصل ۴ نتایج ۵۸
۴-۱- نتایج ۵۹

۴-۱-۱- تحلیل و بررسی توالیهای ژنوم ویروس HIV-1 و HCV جهت انتخاب توالیهای مناسب برای طراحی پرایمر پروب ۵۹
۴-۱-۲- تخلیص RNA ژنوم دو ویروس از پلاسما ۶۱
۴-۱-۳- فرآیند RT-PCR ۶۱
۴-۱-۳-۲- جدا سازی و تخلیص محصولات RT-PCR از ژل آگاروز ۶۲
۴-۱-۳-۳- انجام کلونینگ بر روی قطعات بدست آمده از ژنوم دو ویروس ۶۳
۴-۱-۳-۴- انجام واکنش Colony PCR برای تأیید کلونینگ ۶۴
۴-۱-۳-۵- تخلیص پلاسمید از باکتری ۶۵
۴-۱-۳-۶- نتایج حاصل از توالی یابی (Seqencing) قطعات مورد نظر از ژنوم دو ویروس ۶۶
۴-۱-۳-۷- انجام واکنش Multiplex PCR بر روی پلاسمید حاوی قطعات مورد نظر (به عنوان کنترل مثبت) ۶۶
۴-۱-۴- انجام واکنش Real-Time PCR با SYBER Green I ۶۷
۴-۱-۴-۱- بهینه سازی غلظت SYBER Green I ۶۷
۴-۱-۴-۲- انجام واکنش Multiplex Real-Time PCR با استفاده از SYBER Green I و تفکیک قطعات مورد نظر از ژنوم ویروسها با استفاده از Melting Curve ۶۸
۴-۱-۴-۳- بهینه سازی غلظت کلرید منیزیم ۶۹
۴-۱-۴-۴- بهینه کردن غلظت پرایمر ها ۷۰
۴-۱-۵- انجام واکنش Real-Time PCR با پروب ۷۰
۴-۱-۵-۱- بهینه سازی غلظت کلرید منیزیم و پروب در واکنش PCR ۷۰
۴-۱-۶- انجام واکنش PCR با استفاده از پروب Molecular Beacon ۷۲
۴-۱-۷- ساخت یک RNA مطمئن به عنوان کنترل مثبت برای واکنش NASBA ۷۳
۴-۱-۷-۱- تخلیص و جدا سازی DNA(محصول PCR) از آگاروز ژل ۷۳
۴-۱-۷-۲- ورود محصول PCR در فرآیند Invitro Transcription ۷۴
۴-۱-۷-۳- زدودن DNA از RNA های تولید شده در فرآیند رونویسی ۷۵
۴-۱-۷-۴- حذف آنزیم DNase I ۷۵
۴-۱-۷-۵- انجام واکنش PCR بر روی RNA ی رونویسی شده ۷۶
۴-۱-۷-۶- ایجاد شرایط بهینه برای واکنش NASBA ۷۷
۴-۱-۷-۶-۱- ایجاد شرایط بهینه برای پرایمر ها ۷۷
۴-۱-۷-۶-۲- تأثیر DMSO بر واکنش NASBA ۷۸
۴-۱-۷-۶-۳- بررسی اثر آنزیم RNase H در واکنش NASBA ۷۹
۴-۱-۸- انجام واکنش Multiplex NASBA بر روی ژنوم دو ویروس HCV/HIV-1 ..... ۸۰
۴-۱-۹- واکنش NASBA با استفاده از پروب Molecular Beacon ۸۰
۴-۱-۱۰- انجام واکنش Multiplex NASBA با استفاده از پروب ۸۱
فصل ۵ بحث و پیشنهادها ۸۴
۵-۱- بحث ۸۵
۵-۲- پیشنهادها ۸۸

فصل ۶ مراجع ۸۹

فهرست شکل‌ها

عنوان ..... صفحه
شکل (۱-۱) : نمایی از یک ویرون بالغ HIV-1 ..... ۲
شکل (۱-۲): تشکیلات ژنوم پرتوویروس HIV-1 ..... ۴
شکل (۱-۳) : چرخه همانندسازی ویروس HIV-1 ..... ۵
شکل (۱-۴) : انتشارتخمینی موارد عفونت ایدز/HIV در بالغین واطفال درقاره ها ونواحی مختلف ۵
شکل (۱-۵): تشکیلات ژنوم وفرآورده های ژنهای HCV ۱۱
شکل (۱-۶): منابع عفونت برای افراد با HCV ۱۳
شکل (۱-۷) : توزیع جهانی ویروس هپاتیت C برای انسان ۱۳
شکل (۲-۱): مکانیزم عمل Sandwich ELISA ۱۹
شکل (۲-۲) : مکانیزم عمل Western Bloting ۲۰
شکل (۲-۳) : مکانیزم عمل RT-PCR ۲۲
شکل (۲-۴) : مکانیزم عمل SMART ۲۳
شکل (۲-۵) : مکانیزم عمل RT-SDA ۲۴
شکل (۲-۶) : مکانیزم عمل LAMP ۲۶
شکل (۲-۷): مکانیزم عمل bDNA ۲۶
شکل (۲-۸) : مکانیزم عمل HDA ۲۷
شکل (۲-۹): مکانیزم عمل NASBA ۲۸
شکل (۲-۱۰) : آشکار سازی بر پایه ساختار لیپوزومی ۳۰
شکل (۲-۱۱) : مکانیزم عمل PCR-ELISA ۳۱
شکل (۲-۱۲) : مکانیزم عمل ElectroChemiluminesence ۳۲
شکل (۲-۱۳) : مکانیسم عمل رنگهای فلوروسنت ۳۳
شکل (۲-۱۴) : شکل فضایی اتیدیوم برماید دربین دو رشته DNA ۳۴
شکل (۲-۱۵) : مکانیسم عمل پروبهای Taq Man ۳۵
شکل (۲-۱۶) : مکانیسم عمل پروبهای Hybridization ۳۶
شکل (۲-۱۷) : نمایی ازشماتیک Molecular Beacon ۳۶
شکل (۲-۱۸) : مکانیسم عمل Scorpion Primer ۳۷
شکل (۲-۱۹) : مکانیسم عمل Light-up Probe ۳۷
شکل (۲-۲۰): مکانیسم عمل Sunrise Primers ۳۸
شکل (۲-۲۱) : مکانیسم عمل Lux Primer ۳۹
شکل (۴-۱) : هم ردیفی توالیهای ویروس HCV با نرم افزار Mega 3.1 برای طراحی پرایمر ۶۰
شکل (۴-۲): هم ردیفی توالیهای ویروس HIV-1 با نرم افزار Mega 3.1 برای طراحی پرایمر ۶۰
شکل (۴-۳): PCR روی cDNA ساخته شده از ژنوم HIV-1 ..... ۶۱
شکل (۴-۴) : PCR روی cDNA ساخته شده از ژنوم HCV ۶۲
شکل (۴-۵) : نمونه های تخلیص از ژل دو ویروس HIV-1 و HCV ۶۲

شکل (۴-۶) : نمایی از پلاسمید pTZ57R\T موجود در کیت T/A coloning ۶۳
شکل (۴-۷) : نمایی از انجام عمل کلونینگ ۶۳
شکل (۴-۸) : Colony PCR روی HIV-1 ..... ۶۴
شکل (۴-۹) : Colony PCR روی HCV ۶۴
شکل (۴-۱۰) : تخلیص پلاسمید نمونه HCV ۶۵
شکل (۴-۱۱) : تخلیص پلاسمید نمونه HIV-1 ..... ۶۵
شکل (۴-۱۲) : نتیجه توالی یابی HCV ۶۶
شکل (۴-۱۳) : نتیجه توالی یابی HIV-1 ..... ۶۶
شکل (۴-۱۴) : نتایج Multiplex و Monoplex PCR بر روی HCV و HIV-1 ..... ۶۷
شکل (۴-۱۵) : منحنی Melt ژنوم ویروس HCV که Tm برابر ۸۹/۵ ..... ۶۸
شکل (۴-۱۶) : منحنی Melt ژنوم ویروس HIV-1 ..... ۶۸
شکل (۴-۱۷) : منحنی Melt دو ویروس HIV-1 و HCV بصورت همزمان ۶۹
شکل (۴-۱۸) : بهینه سازی غلظت کلرید منیزیم برای واکنش Real-time SYBER Green1 ..... ۷۰
شکل (۴-۱۹) : PCR Real-time با پروب برای ویروس HIV-1 بهترین غلظت 3mM انتخاب شد ۷۱
شکل (۴-۲۰): واکنش PCR Real-time با پروب برای ویروس HCV بهترین غلظت 3mM انتخاب شد ۷۱
شکل (۴-۲۱) : نمودار تکثیر واکنش PCR Real-time Multiplex از کانال FAM برای HCV ۷۲
شکل (۴-۲۲) : نمودار تکثیر واکنش PCR Real-time Multiplex از کانال JOE برای HIV ۷۳
شکل (۴-۲۳) : محصول تخلیص از ژل برای واکنش Invitro transcription ۷۴
شکل (۴-۲۴) : واکنش invitro transcription قبل وبعد از هضم آنزیمی با DNase1 ..... ۷۴
شکل (۴-۲۵) :RNA های ساخته شده بعد از هضم آنزیمی با DNase 1 ..... ۷۵
شکل (۴-۲۶) : حذف DNase از نمونه HIV با استفاده Trizol ۷۶
شکل (۴-۲۷) : حذف DNase از نمونه HCV با استفاده Trizol ۷۶
شکل (۴-۲۸) : انجام واکنش PCR بر روی RNA و cDNA دو و یروس ۷۷
شکل (۴-۲۹) : انجام واکنش NASBA بر روی HIV با غلظت های مختلف پرایمر ۷۷
شکل (۴-۳۰) : انجام واکنش NASBA بر روی HCV با غلظت های مختلف پرایمر ۷۸
شکل (۴-۳۱) : تاثیر DMSO بروی واکنش NASBA ژنوم HCV ۷۸
شکل (۴-۳۲) : تاثیر DMSO بروی واکنش NASBA ژنوم HIV-1 ..... ۷۹
شکل (۴-۳۳) : تاثیر RNase H بر واکنش NASBA ۷۹
شکل (۴-۳۴) : واکنش Multiplex NASBA بر روی دو ویروس ۸۰
شکل (۴-۳۵) : نمودار تکثیر واکنش HIV-1 از کانال JOE ۸۱
شکل (۴-۳۶) : نمودار تکثیر واکنش HCV از کانال FAM ۸۱
شکل (۴-۳۷) :نمودار تکثیر واکنش NASBA Real-time Multiplex از کانال FAM برای HCV ۸۲
شکل (۴-۳۸) : انجام واکنش NASBA Real-time Multiplex از کانال JOE برای HIV ۸۳

فهرست جدول‌ها

عنوان ..... صفحه
جدول (۱-۱) : تخمین تعداد افراد بزرگسال وکودک مبتلا درایران ۷
جدول (۱-۲): تخمین تعداد افراد مبتلا بهHIV/AIDS که درشرق وجنوب شرق آسیا زندگی می کنند ۸
جدول (۱-۳) : تخمین تعداد افرادی که براثرابتلا بهHIV درشرق وجنوب شرق آسیا فوت کردند ۹
جدول (۱-۴): درصداطمینان ازسلامت خونهای تزریقی درکشورهای آسیایی ۱۰
جدول (۱-۵) : مقایسه دو ویروس HIV-1 وHCV ۱۴
جدول (۳-۱) : اجزای لازم برای واکنش رونوشت برداری معکوس برای تهیه cDNA ۴۳
جدول (۳-۲) : سیکلهای واکنش PCR ۴۴
جدول (۳-۳): اجزای مورد نیاز برای انجام PCR بر روی CDNA تهیه شده ۴۴
جدول (۳-۴) : اجزای موردنیازبرای واکنش لیگاسیون ۴۵
جدول (۳-۵) : سیکلهای واکنش Colony PCR ۴۵
جدول (۳-۶) : اجزای لازم جهت انجام واکنش Colony PCR ۴۶
جدول (۳-۷) : برنامه زمانی واکنش Multiplex PCR ۴۷
جدول (۳-۸) : اجزای مورد نیاز برای Multiplex PCR ۴۷
جدول (۳-۹) : برنامه زمانی مراحل واکنش Real-time PCR برای ژنوم دو ویروس ۴۸
جدول (۳-۱۰) : اجزای لازم برای واکنش Real-time PCR ۴۸
جدول (۳-۱۱) : جدول برنامه زمانی Melting ۴۹
جدول (۳-۱۲): غلظتهای مختلف از پرایمر ها نسبت به یکدیگر در Multiplex PCR ۵۰
جدول (۳-۱۳) : اجزای مورد نیاز برای واکنش Multiplex Real-Time PCR ۵۰
جدول (۳-۱۴) : برنامه زمانی مراحل واکنش Multiplex PCR برای ژنوم دو ویروس ۵۰
جدول (۳-۱۵) : برنامه زمانی Melt برای واکنش Multiplex PCR ۵۱
جدول (۳-۱۶) : جدول زمانی Multiplex PCR با استفاده از پروب ۵۱
جدول (۳-۱۷) : مقادیر مورد نیاز برای Multiplex PCR با پروب ۵۱
جدول (۳-۱۸) : اجزای لازم برای فرآیند In vitro transcription ۵۲
جدول (۳-۱۹) : اجزای لازم برای واکنش NASBA ۵۴
جدول (۳-۲۰) : اجزای لازم برای واکنش Multiplex NASBA ۵۵
جدول (۳-۲۱) : غلظت مختلف از پرایمر ها نسبت به یکدیگر ۵۶
جدول (۳-۲۲) : اجزای لازم برای تهیه بافر RNA leading ۵۶
جدول (۳-۲۳) : اجزای لازم برای واکنش Multiplex NASBA با استفاده از پروب ۵۷
جدول (۴-۱) توالی های پرایمر وپروب برای دو ویروس HIV-1 و HCV ۵۹
جدول (۴-۲) : رقت SYBER Green I ۶۷

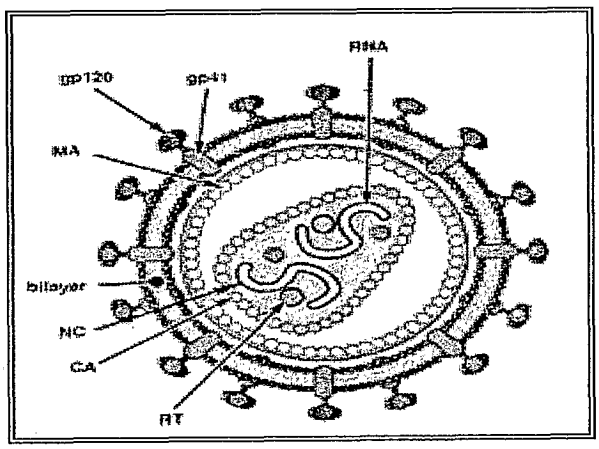
فصل ۱

مقدمه

۱-۱- ویروس نارسایی ایمنی انسانی (HIV)

۱-۱-۱- تاریخچه

انواع ویروس نارسایی ایمنی انسانی (HIV) از لنتی ویروسهای پریماتها مشتق شده اند و عامل ایجاد سندرم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) هستند[۱]. این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ توصیف شد و HIV-1 در اواخر ۱۹۸۳ جدا سازی گردید از آن زمان به بعد بیماری ایدز به صورت یک اپیدمی در سراسر جهان در آمد و جمعیتها و مناطق جغرافیایی مختلفی را درگیر کرده است. اکنون میلیونها نفر درسرتاسر جهان به این ویروس آلوده شده اند و افراد پس از آلودگی تا آخر عمر آلوده باقی می مانند[۲] . در طی یک دهه، در صورت عدم درمان ، اکثریت افراد آلوده بهHIV به علت نارسایی سیستم ایمنی ایجاد شده به وسیله HIV دچار عفونتهای فرصت طلب می شوند . بیماری ایدز یک مشکل عمده سلامتی در سراسر جهان در آغاز قرن ۲۱ است.HIV یک رترو ویروس و عضوی از زیر خانواده لنتی ویروس است . خصوصیت مورفولوژیک HIV بدین صورت است،که ویریون کامل HIV به شکل کروی و به قطر ۱۲۰nm-۱۰۰می باشد و حاوی یک غشاء لیپیدی دو لایه که یک نوکلئوکپسید (هسته) مخروطی شکل را احاطه کرده که این نوکلئوکپسید حاوی دو مولکول RNA ژنومی، پروتئازویروسی،آنزیم نسخه بردار معکوس، اینتگراز،Vif، Vpr،Vpu و Nef و برخی از فاکتورهای سلولی می باشند[۳]. ژنوم HIV-1 دارای دو مولکول RNA تک رشته مشابه به طول 9.2kb می باشد، شکل پایدار ژنوم HIV-1 درسلول های عفونی بصورت DNA دو رشته که پرووایرال نامیده می شود.شکل (۱-۱)



شکل (۱-۱): نمایی از یک ویرون بالغ *HIV-1*

۱-۱-۲- همانند سازی HIV

شروع عفونت با اتصال ویریون ها به سطح سلول با میان کنش بین ناحیه خارج سلولی gp 120 ویروس HIV-1 و گیرنده های سلولی می باشد . CD4 رسپتور اصلی برای HIV-1 و HIV-2 است، هفت گیرنده کموکاین ترانس ممبران CCR5 و CXCR4 از کمک گیرنده های HIV-1 در محیط بین سلول می باشند[۴]. بعد از اتصال به کمک گیرنده ها، ویروس در غشاء سلول فرو رفته و هسته ویروس در داخل سیتوپلاسم سلول رها می شود. ژنوم RNA ویروسی بصورت کامل بوسیله آنزیم RT ویروس به DNA دو رشته رونوشت برداری می شود. صحت رونویسی معکوس تحت تأثیر حضور پروتئین سلولی APOBEC3G یا (CEM15) می باشد.کمپلکس پری اینگریشن که بصورت اتصال مستقیم Vpr، HIV-1 به غشاء هسته و ورود به آن از میان حفره هایی که در هسته می باشد[۵].

قبل از اینتگریشن (تلفیق)DNA ویروس به سه شکل : خطی ، حلقوی 1-LTR یا 2-LTR در هسته یافت می شود. DNA دو رشته خطی در کمپلکس پیش تلفیق (اینتگریشن) بوسیله IN ویروسی درکروموزوم میزبان وارد می شود.وقتی DNA پرووریروس درژنوم میزبان تلفیق شد، رونویسی پرووریروس با RNA پلیمر از IIسلول میزبان آغاز می شود و ترجمه این RNA رونویسی شده به سرعت شروع می شود که تولید سطح پایه از Tat، Rev و Nef را می کند. پروتئین Tat کنترل رونویسی از ژنهای HIV-1 را بر عهده دارد. Tat باعث فعال شدن رونویسی می شود که این کار رااتصال عناصرTARبه LTR ودیگرفعال کننده های رونویسی سلول انجام می دهند.در فاز زودرس سیکل همانند سازی ، فقط mRNA هایی که ویرایش می شوند تولید شده و پروتئینهای تنظیمی Tat، Nef و Rev بیان می شوند[۶].

وقتی ویروس به سطح کافی از Rev می رسد mRNA های ویرایش نشده تولید شده و به پلی زومها انتقال می یابند که منجر به تولید دیگر پروتئینهای ویروسی و RNA ژنومی می شوند . ژن env به پروتئین اولیه gp160 ترجمه شده که در شبکه آندوپلاسمی گلیکوزیله می شود.

ژن gag-pol عمدتاً به پلی پروتئینهای Gag و Gag-Pol ترجمه می شود. پلی پروتئین P55(Gag) اولیه 55KDa وزن دارد که طی فرآیند پروتئولیتیکی در طول بلوغ به شش پروتئین ساختمانی باز آرایی می شوند و تولید ویریون بالغ را می کنند . بطور منظم در طول ترجمه یک تغییر چهار چوب در سطح ریبوزوم اتفاق می افتد که منجر به بیان پلی پروتئین Gag-Pol می شود که بطور عمده شامل آنزیمهای پروتئینی پروتئاز، رونویس بردار معکوس و اینتگراز می شود[۷]. بعد از ترجمه پروتئینهای Env به غشای پلاسمی مهاجرت کرده و در آن الحاق می شوند. شکل (۱-۲)

پلی پروتئینهای Gag- Pol,Gag به سمت غشاء سلولی حرکت کرده و تشکیل ویریون مستقیماً با پلی پروتئین Gag آغاز می شود. بعلاوه آنزیمهای ویروسی، کل RNA ژنومی ، پرایمر tRNAlys3