بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

آقای بهزاد پور حسین رشته ویروس شناسی پزشکی پایان‌نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان « بکارگیری تست LAMP و PCR برای تشخیص ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک » در تاریخ ۱۳۹۰/۶/۲۶ ارائه کردند.

بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

دکتر حوریه سلیمانجاهی (استاد راهنما)

دکتر فریدا بهزادیان (استاد مشاور)

دکتر فاطمه فتوحی (استاد ناظر)

دکتر مهرداد روانشاد (استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)

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

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری 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 هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

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

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین‌نامه-های مصوب انجام شود.

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

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب **بهزاد پورحسین** دانشجوی رشته **ویروس‌شناسی پزشکی** ورودی سال تحصیلی **۱۳۸۸** مقطع **کارشناسی ارشد** دانشکده **علوم پزشکی** متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم ».

امضا
تاریخ ۹۰/۷/۲۳

آئین‌نامه پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (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 می‌شوند:

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

ماده ۲ : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل **پایان‌نامه کارشناسی ارشد** نگارنده در رشته **ویروس‌شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۹۰** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **دکتر حوریه سلیمان‌جاهی**، مشاوره **دکتر فریدا بهزادیان** از آن دفاع شده است.

ماده ۳ : به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به "دفتر نشر آثار علمی" دانشگاه اهداء کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ : در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده ۵ : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت‌های بهای خسارت، دانشگاه مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶ : اینجانب **بهزاد پورحسین** دانشجوی رشته **ویروس‌شناسی پزشکی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی بهزاد پورحسین

تاریخ و امضا

۹۰/۷/۲۳

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته ویروس‌شناسی پزشکی

عنوان

به کارگیری تست LAMP و PCR برای تشخیص ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک

نگارش

بهزاد پورحسین

استاد راهنما

دکتر حوریه سلیمان‌جاهی

استاد مشاور

دکتر فریدا بهزادیان

تابستان ۱۳۹۰

تقدیم به:

ساحت مقدس امام عصر، مهدی موعود عج‌الله تعالی فرجه شریف

که جهانی منتظر دیدار اوست

روی بنما و وجود خودم از یاد ببر — خرمن سوختگان را همه گو یاد ببر

ما که دادیم دل و دیده به طوفان بلا — گو بیا سیل غم و خانه ز بنیاد ببر

روز مرگم، نفسی وعده دیدار بده — وانگهم تا به لحد خرم و دلشاد ببر

و استاد بزرگوارم،

به پاس همه بخشندگی‌هایش

که دستانم را دلسوزانه گرفت و مرا آموخت استوار و قاطع قدم برداشتن در مسیر زندگی و کلامش که آکنده از نور الهی است چراغی شده که تا همیشه، زندگی‌ام را معنا می‌بخشد.

و پدر و مادرم،

به شکرانه‌ی همه دلواپسی‌هایشان

آنان که با بذل عشق ابدیشان، به من چگونه زیستن را آموختند تا روحی فناناپذیر داشته باشم. خاک قدمگاهشان را سرمه چشمانم می‌کنم تا دیدگانم با وسعت هستی پیوند بخورد و به بی‌کرانه‌های الوهیت برسد.

و

همسر عزیزم

به خاطر همه‌ی دوستی‌هایش

تشکر و قدردانی

«سنریهم آیاتنا فی الافاق و فی انفسهم حتی یتبین لهم انه الحق او لم یکف بربک انه علی کل شیء شهید»

چه زود خواهد بود که نشانه‌های خود را در سراسر جهان خارج و جهان جان به آنان نشان می‌دهم تا خداوند باری تعالی برایشان به طور آشکار جلوه کند. مگر نه این است که خداوند شما بر همه چیز و بر همه ذرات وجود شاهد و ناظر و حاضر است؟

سپاس خدای را که با لطف و کرمش هستی را حیات بخشید و هزاران نکته و معما در آن جای داد و سخنش را با کلمه خواندن آغاز نمود تا بندگان را به کشف راز و رمزهای آفرینش ترغیب نماید. اکنون که به یاری یگانه هستی-بخش، مراحل انجام پایان‌نامه به پایان رسیده است، مراتب سپاس و قدردانی خود را از افراد ذیل ابراز می دارم:

خالصانه‌ترین سپاس نثار استاد فرزانه، سرکار خانم دکتر سلیمان‌جاهی که در تمام مراحل زندگی، مرا یار و پشتیبان بودند و سخاوتمندانه مرا از چشمه تجربیات و معلوماتشان، سیراب نمودند.

استاد عزیز و بزرگوار، سرکار خانم دکتر فریدا بهزادیان که در کمال فروتنی و سعه صدر، مرا در انجام این رساله هدایت نمودند.

استاد عزیز و گرامی سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی که یاری و همراهی بی‌دریغ ایشان، پشتوانه محکمی برای ادامه راه بود. او که در مکتب عشقش، چگونه خالصانه زیستن را برای طی صراط مستقیم آموختم.

اساتید گرامی، سرکار خانم دکتر طراوت بامداد و جناب آقای دکتر مهرداد روانشاد که در تمام مراحل تحصیل، صبر، بزرگ‌اندیشی و ایثار را به معنای کامل کلمه‌ی مقدس معلم به ما نشان دادند.

دوستان عزیزم جناب آقای بهزاد خوانساری‌نژاد و سرکار خانم مرضیه جمالی دوست به دلیل راهنمایی‌های بی-دریغ و زحماتی که در انجام این پایان‌نامه متحمل شدند.

سرکار خانم جماعتی و جناب آقای سید کیوان قاضی میرسعید، کارشناسان محترم بخش ویروس‌شناسی که با کمک‌های بی دریغ خود مرا یاری نمودند.

از کلیه دانشجویان محترم گروه ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس که در تمام مراحل انجام رساله از مساعدت‌ها و حمایت‌های آنان استفاده کردم.

چکیده

همچنان عفونت با هرپس سیمپلکس ویروس‌ها، به عنوان یک مسأله‌ی جهانی که تهدیدکننده‌ی سلامت افراد است، باقی مانده است. به طوری که مادران حامله بدون علامت می‌توانند توسط این ویروس باعث انسفالیت مرگبار در جنین خود گردند. بیماری‌های متعددی توسط تیپ یک این ویروس ایجاد می‌گردد که مهم‌ترین آن انسفالیت در نوزادان می‌باشد که هدف این مطالعه، توسعه‌ی یک تکنیک سریع، آسان و دارای حساسیت و ویژگی بالا برای تشخیص این ویروس در مایع مغزی نخاعی می‌باشد.

در این مطالعه، روش LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) به عنوان یک تکنیک سریع با حساسیت و ویژگی بالا، برای تشخیص ویروس HSV-1 در نمونه‌های مایع مغزی نخاعی آلوده به این ویروس راه‌اندازی شد. ابتدا، این ویروس در محیط کشت سلولی رشد داده شد و بعد از استخراج ژنوم آن، از قطعه‌ای از ژنوم به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید؛ جهت بررسی کار، ۱۸ نمونه‌ی اخذشده از کودکان زیر هفت سال مبتلا به انسفالیت هرپس ویروسی تیپ یک بستری در بیمارستان‌های دی تهران و نمازی شیراز جمع‌آوری گردید. حساسیت و ویژگی تست در تشخیص ویروس HSV-1 به ترتیب ۵۰۰ copies/tube و ۹۹/۹ درصد به ترتیب بود. تشخیص مثبت بودن در این تست از طریق الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۵ درصد و یا بررسی چشمی کدورت در لوله صورت گرفت؛ در نهایت، داده‌های به دست آمده با نتایج حاصل از Real-Time PCR و PCR مقایسه گردید که نشان داد نتایج تا حدود زیادی با یکدیگر مطابقت دارند.

در این مطالعه، تکرارپذیری و قابلیت اعتماد واکنش LAMP در ارتباط با تشخیص ویروس HSV-1 بررسی و مورد تأیید نهایی قرار گفت؛ نتایج نشان دادند که این روش به عنوان تکنیکی ساده، ارزان و سریع می‌تواند در آینده مورد استفاده‌های بیشتری در تشخیص بیماری‌های عفونی به ویژه ویروس‌ها خصوصاً در مناطق محروم قرار گیرد.

کلمات کلیدی: روش LAMP (Loop mediated Isothermal Amplification Method)، انسفالیت هرپسی (HSE)، حساسیت، ویژگی و روش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه، کلیات و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه ۱

۱-۲. طبقه‌بندی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک ۲

۱-۳. ساختار ویروس ۲

۱-۴. پروتئین‌های ویروس ۳

۱-۵. نحوه تکثیر ویروس ۴

۱-۶. بیماری‌زایی ۵

۱-۷. نهفتگی ویروس ۶

۱-۸. پاسخ ایمنی میزبان در عفونت‌های ناشی از HSV ۶

۱-۹. اپیدمیولوژی ۸

۱-۱۰. کنترل عفونت‌های HSV ۹

۱-۱۰-۱. پیشگیری ۹

۱-۱۰-۲. درمان ۹

۱-۱۱. تشخیص آزمایشگاهی ۱۰

۱-۱۱-۱. روش‌های تشخیصی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۱۱

۱-۱۱-۲. روش‌های تشخیصی تکثیر تک‌دمایی وابسته به حلقه ۱۲

۱-۱۱-۲-۱. آشنایی با واکنش تکثیر تک‌دمایی وابسته به حلقه ۱۳

۱-۱۱-۳. مشخصات روش LAMP ۱۷

۱-۱۱-۴. میزان حساسیت LAMP ۱۸

۱-۱۱-۵. مزایای LAMP ۱۸

۱-۱۱-۶. مواد لازم برای انجام واکنش LAMP ۱۹

عنوان **صفحه**

۱-۱۱-۶-۱. آنزیم *Bst*پلیمراز ۱۹

۱-۱۱-۶-۲. دزوکسی نوکلئوزیدهای تری‌فسفاته ۲۱

۱-۱۱-۶-۳. بافر و MgSO4 ..... ۲۱

۱-۱۱-۶-۴. آغازگرها ۲۲

۱-۱۱-۶-۵. DNA هدف ۲۴

۱-۱۱-۶-۶. مواد شیمیایی بی‌ثبات‌کننده‌ی مارپیچ DNA ۲۴

۱-۱۱-۷. شرایط انجام واکنش ۲۴

۱-۱۱-۷-۱. فاز مقدماتی واکنش ۲۵

۱-۱۱-۷-۲. فاز اصلی واکنش LAMP ۲۹

۱-۱۱-۸. بهینه‌سازی شرایط LAMP و عوامل مؤثر در واکنش ۳۱

۱-۱۱-۹. روش‌های آشکارسازی در LAMP ۳۲

۱-۱۱-۹-۱. روش مشاهده‌ای ۳۲

۱-۱۱-۹-۲. تشخیص مشاهده‌ای به وسیله‌ی فلورسانس ۳۵

۱-۱۱-۹-۳. روش الکتروفورز ۳۵

۱-۱۱-۹-۴. روش Real-Time LAMP و آنالیز کمی ۳۶

۱-۱۱-۱۰. سرعت بخشیدن به واکنش LAMP با استفاده از آغازگرهای حلقوی ۳۶

۱-۱۱-۱۰-۱. مزایای آغازگرهای حلقوی ۳۷

۱-۱۱-۱۱. SNPs typing بر مبنای LAMP ۳۸

۱-۱۱-۱۲. روش RT-LAMP ۳۸

۱-۱۱-۱۳. معایب روش LAMP ۳۹

۱-۱۱-۱۴. چشم‌انداز آینده ۳۹

عنوان **صفحه**

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱. اهداف ۴۲

۲-۱-۱. هدف کلی ۴۲

۲-۱-۲. اهداف جزئی ۴۲

۲-۲. فرضیه ۴۲

۲-۳. کشت سلول ۴۲

۲-۴. تکثیر ویروس HSV-1 سویه KOS در سلول‌های HeLa ۴۳

۲-۵. استخراج ژنوم ویروس HSV-1 از سلول‌های HeLa و خالص‌سازی آن ۴۴

۲-۶. PCR جهت استخراج قطعه‌ی ژنومی gG و تکثیر آن ۴۶

۲-۶-۱. طراحی آغازگر برای قطعه‌ی gG ۴۶

۲-۶-۲. آماده‌سازی آغازگرها ۴۷

۲-۶-۳. دی‌اکسی نوکلئوزید تری‌فسفات (dNTP) ۴۸

۲-۶-۴. بافر MgCl2 ..... ۴۸

۲-۶-۵. روغن معدنی ۴۹

۲-۶-۶. مارکر DNA ۴۹

۲-۶-۷. دستگاه ترموسایکلر ۴۹

۲-۶-۸. جداسازی ژن تکثیرشده از سایر اجزای موجود در محصول PCR ۵۰

۲-۷. باکتری مستعد ۵۱

۲-۷-۱. روش تهیه‌ی باکتری مستعد جهت دریافت پلاسمید pBluescript SK(-) ۵۱

۲-۷-۱-۱. روش فریز کردن باکتری‌های مستعد ۵۳

۲-۷-۲. انتقال پلاسمید به درون سلول باکتری (ترانسفورمیشن) ۵۳

۲-۷-۲-۱. استخراج پلاسمید در مقیاس کم ۵۵

عنوان	صفحه

۲-۸. روش انجام الکتروفورز ۵۹

۲-۸-۱. روش تهیه‌ی محلول‌های مورد نیاز جهت الکتروفورز ۵۹

۲-۸-۲. روش تهیه‌ی ژل ۶۱

۲-۹. ارزیابی کیفی پلاسمید استخراج شده ۶۲

۲-۹-۱. ارزیابی کمی میزان پلاسمید ۶۳

۲-۱۰. کلون نمودن قطعه‌ی HSV-1 gG درون پلاسمید pBluescript SK(-) ۶۳

۲-۱۰-۱. هضم دو آنزیمی پلاسیمد pBluescript SK(-) ۶۳

۲-۱۰-۲. هضم دو آنزیمی قطعه‌ی gG خالص‌شده از محصول PCR ۶۴

۲-۱۰-۳. لایگشین قطعه‌ی HSV-1 gG درون پلاسمید مربوطه ۶۵

۲-۱۰-۳-۱. ترانسفورم کردن محصول لایگیشن ۶۷

۲-۱۰-۴. بررسی کلونی‌های حاصل از ترانسفورمیشن جهت تأیید وجود کلون ۶۷

۲-۱۰-۵. تأیید با هضم آنزیمی ۶۸

۲-۱۱. آغازگرهای استفاده شده در LAMP ۶۸

۲-۱۲. بهینه‌سازی واکنش LAMP ۶۹

۲-۱۳. انجام LAMP بر روی رقت‌های مختلف نمونه‌ی استاندارد جهت تعیین حساسیت واکنش ۶۹

۲-۱۳-۱. خطی‌سازی پلاسمید نوترکیب جهت تعیین میزان کپی در هر تیوب ۶۹

۲-۱۳-۲. تهیه‌ی رقت‌های سریال از پلاسمید خطی شده ۷۰

۲-۱۳-۳. تعیین حساسیت واکنش LAMP ۷۱

۲-۱۳-۴. انجام الکتروفورز بر روی محصولات تولید شده ۷۲

۲-۱۴. انجام LAMP بر روی نمونه‌های خانواده‌ی هرپس‌ویریده، چند ویروس ایجادکننده‌ی انسفالیت و ژنوم انسانی جهت تعیین ویژگی واکنش ۷۲

۲-۱۵. جمع‌آوری نمونه‌های بالینی از بیمارستان‌های شهر تهران و شیراز ۷۲

عنوان **صفحه**

۲-۱۶. انجام PCR و LAMP بر روی نمونه‌های بالینی و مقایسه‌ی نتایج با یکدیگر ۷۳

فصل سوم: نتایج

۳-۱. نتایج کشت سلول HeLa و القاء ویروس HSV-1 سویه‌ی KOS به آن‌ها و در نهایت، استخراج ژنوم ویروس از محیط کشت ۷۵

۳-۲. نتیجه‌ی حاصل از PCR جهت استخراج قطعه‌ی ژنومی gG و تکثیر آن ۷۶

۳-۲-۱. خالص‌سازی قطعه‌ی ژنومی DNA ۱۱۰۰bp از سایر ترکیبات موجود در واکنش PCR ۷۷

۳-۳. نتایج حاصل از تکثیر پلاسمید pBluescript SK(-) در مقیاس کم و هضم پلاسمید و ژن gG با آنزیم‌های محدودگر ۷۷

۳-۴. لایگیشن قطعه‌ی gG درون وکتور pBluescript SK(-) ۷۸

۳-۴-۱. انجام هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pBluescript SK(-)-gG جهت تأیید وجود قطعه‌ی gG ۷۸

۳-۴-۲. تکثیر پلاسمید pBluescript SK(-)-gG در مقیاس اندک جهت استفاده به عنوان کنترل مثبت قطعی ۷۹

۳-۵. بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر در تست LAMP ۷۹

۳-۵-۱. بهینه‌سازی دمای مطلوب جهت انجام واکنش ۷۹

۳-۵-۲. بهینه‌سازی بتائین جهت انجام واکنش ۸۰

۳-۵-۳. بهینه‌سازی رقت dNTPs ۸۱

۳-۵-۴. بهینه‌سازی زمان جهت انجام واکنش ۸۲

۳-۵-۵. بهینه‌سازی $MgSO_4$ جهت انجام واکنش ۸۳

۳-۶. کدورت‌سنجی در واکنش LAMP ۸۴

۳-۷. بررسی حساسیت آنالیتیکالی واکنش LAMP ۸۴

۳-۸. بررسی ویژگی آنالیتیکالی واکنش LAMP ۸۶

عنوان **صفحه**

۳-۹. نتیجه‌ی بررسی حساسیت روش PCR بر روی کنترل مثبت قطعی ۸۷
۳-۱۰. نتیجه‌ی مقایسه‌ی واکنش LAMP با PCR بر روی نمونه‌های بالینی ۸۷

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها

۴-۱. انتخاب ویروس، انتخاب ژن و طراحی مطالعه ۹۱
۴-۲. طراحی روش LAMP ۹۵
۴-۳. نتیجه‌گیری ۹۶
۴-۴. پیشنهادات ۹۷
فهرست منابع ۹۹
چکیده انگلیسی ۱۰۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱. مقایسه بین *Bst*پلیمراز و *Taq*پلیمراز ۲۰

جدول ۲-۱. برنامه PCR ۵۰

جدول ۲-۲. پرایمرهای واکنش LAMP ۶۹

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱. الف) دستگاه چرخه‌ی حرارتی (ترموسایکلر)؛ ب) مراحل انجام PCR. ۱۴

شکل ۱-۲. نمایش آغازگرها و ژن هدف در واکنش LAMP..... ۲۲

شکل ۱-۳. بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله‌ی اول: FIP به DNA الگوی تک‌رشته‌ای متصل می‌شود و سنتز DNA آغاز می‌شود..... ۲۶

شکل ۱-۴. بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله‌ی دوم: با فعالیت DNAپلیمراز در ازاء فعالیت جابجایی رشته، یک رشته‌ی مکمل از روی DNA الگو سنتز می‌شود..... ۲۶

شکل ۱-۵. بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله‌ی سوم: آغازگر بیرونی F3 به ناحیه‌ی F3c روی DNA هدف متصل می‌شود و سنتز DNA رشته‌ی جایگزین، آغاز می‌شود. ۲۷

شکل ۱-۶. بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله‌ی چهارم: DNA دورشته‌ای شکل می‌گیرد..... ۲۷

شکل ۱-۷. بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله‌ی پنجم: FIP متصل شده مکمل رشته‌ی الگو به عنوان یک تک‌رشته جدا می‌شود. ۲۷

شکل ۱-۸. بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله‌ی ششم: سنتز DNA با BIP و متعاقباً رشته‌ی DNA جایگزین شده به واسطه‌ی آغازگر B3 سنتز می‌شود..... ۲۸

شکل ۱-۹. بخش مقدماتی واکنش LAMP مرحله‌ی هفتم: DNA دورشته‌ای تشکیل می‌شود..... ۲۸

شکل ۱-۱۰. بخش اصلی واکنش LAMP مرحله‌ی هشتم: ساختار دمبل‌مانند تشکیل می‌شود. این ساختار به عنوان ساختار آغازین برای چرخه‌ی تکثیر در واکنش LAMP به کار گرفته می‌شود..... ۲۹

شکل ۱-۱۱. بخش اصلی واکنش LAMP مرحله‌ی هشتم تا یازدهم: محصولات اصلی واکنش طی پروسه‌ای پیوسته تولید می‌شوند. ۳۰

شکل ۱-۱۲. مکانیسم واکنش SNPs typing بر مبنای LAMP، در همان مراحل آغازین ژنی که آلل جهش‌یافته را داراست قادر به ادامه‌ی سنتز DNA از ساختار دمبل نیست..... ۳۷

شکل ۲-۱. پلاسمید pBluescript SK(-) و جایگاه لایگشین قطعه‌ی gG درون آن ۶۶

عنوان **صفحه**

شکل ۳-۱. (الف) سلول‌های HeLa قبل از تلقیح ویروس HSV-1. (ب) ایجاد CPE، ۴۸ ساعت پس از تلقیح ویروس HSV-1 ..... ۷۵

شکل ۳-۲. دسته‌ی اول شماره‌های ۴-۱ که به ترتیب حاوی غلظت‌های MgCl2، ۲/۵mM، ۲mM، ۱/۵mM و ۱mM و دسته‌ی دوم، شماره‌های ۹-۵ که به ترتیب حاوی غلظت‌های MgCl2، ۳mM، ۲/۵mM، ۲mM، ۱/۵mM و ۱mM بودند. ۷۶

شکل ۳-۳. (الف) نتیجه‌ی تکثیر پلاسمید pBluescript SK(-) در مقیاس اندک که بر روی ژل ۱درصد الکتروفورز گردید. (ب) ۱: نتیجه‌ی هضم دوتایی قطعه‌ی حاصل از PCR و ۲: هضم پلاسمید pBluescript SK(-) ۷۷

شکل ۳-۴. تأیید وجود قطعه‌ی gG درون پلاسمید نوترکیب pBluescript SK(-)-gG ۷۸

شکل ۳-۵. الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب دمای مؤثر برای انجام واکنش. ۸۰

شکل ۳-۶. الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب غلظت مناسب بتائین برای انجام واکنش. ۸۱

شکل ۳-۷. الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب غلظت مناسب dNTPs برای انجام واکنش..... ۸۲

شکل ۳-۸. الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب زمان مناسب برای انجام واکنش. ۸۲

شکل ۳-۹. الکتروفورز محصول LAMP جهت انتخاب غلظت مناسب MgSO4. ..... ۸۳

شکل ۳-۱۰. نمایش کدورت‌سنجی بعد از انجام واکنش LAMP. ۸۴

شکل ۳-۱۱. نتیجه‌ی بررسی حساسیت آنالیتیکالی بر روی ژل ۱/۵ درصد. ۸۵

شکل ۳-۱۲. تعیین ویژگی واکنش LAMP ۸۶

شکل ۳-۱۳. تعیین حساسیت واکنش PCR ۸۷

شکل ۳-۱۴. نتیجه‌ی مقایسه‌ی واکنش‌های PCR و LAMP بر روی نمونه‌های بالینی. ۸۸

شکل ۳-۱۵. نتیجه‌ی مقایسه‌ی واکنش‌های PCR و LAMP بر روی نمونه‌های بالینی ۸۹

شکل ۳-۱۶. نتیجه‌ی مقایسه‌ی واکنش‌های PCR و LAMP بر روی نمونه‌های بالینی. ۸۹

فصل اول

مقدمه

و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک[1] از اعضای خانواده هرپس‌ویریده می‌باشد. دارای DNA دورشته-ای به طول ۱۵۲ کیلو جفت باز بوده و از بزرگ‌ترین ویروس‌های انسانی به شمار می‌رود. ویروس هرپس سیمپلکس در اثر تماس مستقیم از یک شخص به شخص دیگر منتقل می‌شود. این ویروس دارای انتشار بسیار وسیعی در سطح جمعیت بوده و افراد در جوامعی با وضعیت اقتصادی و معیشتی پایین، تا ۹۰ درصد به آن آلوده هستند. از ویـژگی‌های منحصر به فرد این ویروس، نهفتگی و ایجاد عفونت ماندگار در بدن می‌باشد. پس از عفونت اولیه، ویروس در گانگلیون سه شاخه و یا خاجی نهفته می‌شود و سپس در اثر عوامل مختلف مانند تب، سرما، اشعه‌ی ماوراء بنفش، فشارهای عصبی و غیره فعال شده و از طریق گانگلیون حسی، مجدداً خود را به سطح اپی‌تلیال رسانده و ایجاد عفونت راجعه می‌کند به طوری‌که عفونت اولیه معمولاً در سنین کودکی رخ می‌دهد و عموماً بدون علامت می‌باشد [۱]؛ در مجموع این ویروس‌ها، عامل بسیاری از ضایعات مخاطی در قسمت دهان، بینی، پوست و مجاری تناسلی می‌باشند، همچنین قادر به ایجاد عفونت‌های شدید منتشر، کراتیت و انسفالیت در کودکان و افراد دچار نقص ایمنی هستند. بسیاری از افراد تا سن بلوغ به HSV-1 آلوده می‌شوند [۱].

مطالعات ایمنی شناسی نشان داده که هر دو بازوی سیستم ایمنی، یعنی ایمنی هومورال و سلولی، در جلوگیری و محدود کردن عفونت ناشی از HSV-1 مؤثر می‌باشند، ولی در این میان ایمنی سلولی و سلول‌های T سایتوتوکسیک، از نقش کلیدی برخوردار هستند [۱].

[1]. Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)

به دلیل خصوصیت نهفتگی، عود مجدد، مشخص نبودن دقیق چگونگی وقوع این پدیده و نیز مؤثر نبودن درمان‌های دارویی، خصوصاً در جلوگیری از نهفتگی و عود ویروس، به نظر می‌رسد که راه مناسب برای مهار این ویروس استفاده از واکسن باشد [۲].

۱-۲. طبقه‌بندی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک متعلق به خانواده هرپس ویریده [۱] می‌باشد. خانواده هرپس ویریده، به سه زیر خانواده آلفا هرپس ویرینه [۲]، بتا هرپس ویرینه [۳] و گاما هرپس ویرینه [۴] طبقه‌بندی می‌شود [۱، ۳].

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در زیر خانواده آلفا هرپس ویرینه قرار دارد. ویروس‌های زیرخانواده آلفا هرپس ویرینه محدوده میزبانی وسیع داشته و به شدت سیتولیتیک می‌باشند. این ویروس-ها چرخه‌ی تکثیر کوتاه داشته، در کشت سلول انتشار سریعی داشته و همچنین تمایل به ایجاد عفونت نهفته در سلول‌های عصبی دارند. ویروس‌های این زیر خانواده به دو جنس سیمپلکس ویروس [۵] و واریسلوویروس [۶] تقسیم می‌شوند. ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در جنس سیمپلکس ویروس قرار دارد [۱].

۱-۳. ساختار ویروس

ویروس هرپس سیمپلکس دارای کپسید بیست وجهی شامل ۱۶۲ کپسومر و ژنومی متشکل از DNA دورشته‌ای خطی می‌باشد. کپسید ویروس توسط پوشش لیپیدی در برگرفته می‌شود که حاوی ۱۲ گلیکوپروتئین می‌باشد. میان کپسید و غشای خارجی، یک ماده بدون شکل و غیرمتقارن وجود دارد که

---

1. Herpesviridae
2. Alphaherpesvirinae
3. Betaherpesvirinae
4. Gammaherpesvirinae
5. Simplexvirus
6. Varicellovirus