فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته 1

1-1. HTLV-I 2

1-1-1. اپیدمیولوژی 2

1-1-2. ویروس‌شناسی HTLV-I 3

1-1-3. چرخه زندگی HTLV-I 4

1-1-4. دسته‌بندی HTLV-I و زیرگونه‌ها 5

1-2. HBV 6

1-2-1. اپیدمیولوژی 6

1-2-2. ویروس‌شناسی HBV 7

1-2-3. چرخه زندگی 8

1-2-3-1. اتصال و ورود 8

1-2-3-2. خروج نوکلئوکپسید و انتقال به هسته 9

1-2-3-3. سرهم‌بندی نوکلئوکپسید 9

1-2-3-4. جوانه زدن و ترشح ویروس 10

1-3. روش‌های تشخیصی بر پایه اتصال آنتی‌ژن به آنتی‌بادی 11

1-3-1. الایزا (ELISA) 12

1-3-2. ایمونوبلات 13

1-4. مروری بر روش‌های تشخیص مولکولی 14

1-4-1. هیبریداسیون اسید های نوکلئیک 14

1-4-2. توالی‌یابی اسیدهای نوکلئیک 14

1-4-3. تکثیر اسیدهای نوکلئیک 15

1-4-3-1. روش‌های تکثیر وابسته به سیکل‌های دمایی 15

1-4-3-1-1. PCR 15

1-4-3-1-2. RT-PCR 16

1-4-3-1-3. Multiplex –PCR 17
1-4-3-2. روش‌های هم دما 17
1-4-2-3-1. SMART 17
1-4-2-3-2. RT-SDA 18
1-4-2-3-3. LAMP 19
1-4-2-3-4. bDNA 21
1-4-2-3-5. HAD 21
1-4-2-3-6. NASBA 22
1-5. روش‌های آشکار سازی و شناسایی 24
1-5-1. آگاروز ژل الکتروفورز 24
1-5-2. آشکارسازی بر پایه ساختار لیپوزومی 24
1-5-3. آشکارسازی بر پایه کروماتوگرافی الیگونوکلئوتیدها 25
1-5-4. ELISA 26
1-5-5. ECL 27
1-5-6. Real-time PCR 28
1-6. مفاهیم مورد استفاده در Real-time PCR 28
1-6-1. نمودار تکثیر 28
1-6-2. فلورسنت آستانه 29
1-6-3. سیکل آستانه 29
1-6-4. نمودار ذوب 29
1-6-5. کارایی PCR(E) 30
1-7. روش‌های آشکارسازی در Real –Time 30
1-7-1. استفاده از رنگهای فلوروسنت 31
1-7-1-2. گروه یک 31
1-7-1-3. گروه دوم 32
1-7-1-4. گروه سوم 32

1-7-2. استفاده از پروبهای اختصاصی 32
1-7-2-1. 5' Nuclease Probes 32
1-7-2-2. Adjacent hybridization Probes 33
1-7-2-3. Hairpin Probes 34
1-7-2-4. Light-up Probes 36
1-7-2-5. Sunrise Primers 36
1-7-2-6. Lux Primers 37
1-8. تجزیه و تحلیل اطلاعات کمی 38
1-8-1. تعیین کمیت مطلق 38
1-8-2. تعیین کمیت نسبی 38
1-8-2-1. روش DDCt 39
1-8-2-2. روش Pfaffle 39
1-9. مزایای Multiplex Real-Time PCR 40

فصل دوم: مواد و روشها 41
2-1. پرایمرها و پروب‌ها 42
2-1-1. نکات مهم در طراحی پروب‌های Molecular Beacon 42
2-1-2. طراحی Molecular Beacon 43
2-2. استخراج ژنوم سه ویروس HBV و HTLV-I و HIV-I 44
2-2-1. HBV 44
2-2-2. HTLV 44
2-2-3. استخراج RNA از ژنوم ویروس HIV-1 45
2-3. تکثیر قطعه مورد نظر 45
2-3-1. واکنش رونوشت برداری معکوس بر روی RNA ژنوم HIV-1 45
2-3-2. انجام واکنش PCR و بهینه‌سازی آن بر روی cDNA تهیه شده از ویروس HIV-I 46
2-3-3. انجام واکنش PCR و بهینه‌سازی آن بر روی HBV DNA و HTLV 47

2-4. آشکارسازی محصولات PCR با آگاروز ژل الکتروفورز 47
2-5. کلونینگ قطعات مورد نظر 48
2-5-1. جدا سازی و تخلیص محصولات PCR از ژل آگاروز 48
2-5-2. انجام واکنش لیگاسیون بر روی قطعات بدست آمده از ژنوم سه ویروس 48
2-5-3. انجام واکنش Colony PCR برای تأیید ورود قطعات ژنوم ویروس‌ها 49
2-5-4. تخلیص پلاسمید از باکتری ترانسفورمه 49
2-5-5. آشکارسازی محصولات استخراج شده (پلاسمید) با آگاروز ژل الکتروفورز 50
2-5-6. بررسی نتایج بدست آمده از توالی‌یابی 50
2-5-7. تهیه استوک از باکتریهای ترانسفورمه شده به عنوان نمونه کنترل مثبت و بهینه‌سازی واکنشPCR ... 50
2-6. تهیه استاندارد پلاسمیدی جهت تهیه منحنی استاندارد برای آنالیز کمی 50
2-7. واکنش Real-time PCR 51
2-7-1. انجام واکنش Monoplex Real-time PCR با استفاده از SYBER GreenI (SG) 51
2-7-2. انجام واکنش Multiplex Real-Time PCR بـا اسـتفاده از SYBER Green I و تفکیـک قطعـات ژنـوم ویروس‌ها با استفاده از Melting Curve 53
2-7-3. انجام واکنش Multiplex Real-Time PCR با استفاده از SYBER Green I و تفکیک قطعات ژنوم سـه ویروسHBV،HIV و HTLV با استفاده ازMelting Curve 55
2-7-4. انجام واکنش PCR با استفاده از پروب Molecular Beacon 56

فصل سوم: نتایج 57
3-1. تحلیل و بررسی توالی‌های ژنوم ویروسHIV، HBV و HTLV-I جهت انتخاب توالی‌های مناسب برای طراحی پرایمر پروب 58
3-2. انجام کلونینگ بر روی قطعات بدست آمده از ژنوم سه ویروس 61
3-3. انجام واکنش Colony PCR برای تأیید کلونینگ 62
3-4. تخلیص پلاسمید از باکتری 63
3-5. نتایج حاصل از توالی‌یابی (Seqencing) قطعات مورد نظر از ژنوم دو ویروس 64
3-6. انجام واکنش Real-Time PCR با SYBER Green I 65

3-6-1. بهینه‌سازی غلظت SYBER Green I 65
3-6-2. 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 66
3-7. بهینه‌سازی غلظت مواد در واکنش PCR 67
3-7-1. بهینه‌سازی غلظت پرایمرها 67
3-7-2. بهینه‌سازی غلظت کلرید منیزیم 67
3-8. انجام واکنش Multiplex Real-Time PCR با پروب 70
3-8-1. بهینه‌سازی پروب در واکنش PCR 70
3-8-2. انجام واکنش Multiplex Real Time PCR روی رقت سریال استانداردهای پلاسمیدی 71
3-8-3. بررسی حساسیت تست multiplex real time PCR جهت بررسی حساسیت تست 76
3-8-4. بررسی اختصاصیت تست multiplex real time PCR 76
3-8-5. بررسی تکرار پذیری تست multiplex real time PCR 77
3-8-5-1. Intra-assay 77
3-8-5-2. Inter-assay 77

فصل چهارم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها 79
4-1. بحث 80
4-2. ضریب همبستگی (R^2) 84
4-3. نکات مهمی که در ضمن طراحی پرایمرهای Molecular Beacon باید توجه کرد 86
4-4. پیشنهادها 87

فهرست منابع 88
چکیده انگلیسی 95

فهرست جداول

جدول 2-1. اجزای لازم برای واکنش رونوشت برداری معکوس برای تهیه cDNA 45

جدول 2-2. سیکلهای واکنش PCR 46

جدول 2-3. اجزای مورد نیاز برای انجام PCR بر روی cDNA تهیه شده 46

جدول 2-4. سیکلهای واکنش PCR 47

جدول 2-5. اجزای مورد نیاز برای انجام PCR بر روی cDNA تهیه شده 47

جدول 2-6. اجزای موردنیازبرای واکنش لیگاسیون 48

جدول 2-7. سیکلهای واکنش Colony PCR 49

جدول 2-8. اجزای لازم جهت انجام واکنش Colony PCR 49

جدول 2-9. برنامه زمانی مراحل واکنش Real-time PCR برای ژنوم دو ویروس 52

جدول 2-10. اجزای لازم برای واکنش Real-time PCR 52

جدول 2-11. جدول برنامه زمانی Melting 52

جدول 2-12. اجزای مورد نیاز برای واکنش Multiplex Real-Time PCR برای دو ویروس HBV و HTLV 54

جدول 2-13. برنامه زمانی مراحل واکنش Multiplex PCR برای دو ویروس HBV وHTLV 54

جدول 2-14. برنامه زمانی Melt برای واکنش Multiplex PCR برای دو ویروس HBV وHTLV 54

جدول 2-15. اجزای مورد نیاز برای واکنش Multiplex Real-Time PCR برای سه ویروسHIV، HBV و HTLV 55

جدول 2-16. برنامه زمانی مراحل واکنش Multiplex PCR برای سه ویروسHIV، HBV وHTLV 55

جدول 2-17. جدول زمانی Multiplex PCR با استفاده از پروب 56

جدول 2-18. مقادیر مورد نیاز برای Multiplex PCR با پروب 56

جدول 3-1. توالی‌های پرایمر وپروب برای دو ویروس HBV و HTLV-I 59

جدول 3-2. رقت SYBER Green I 65

جدول 3-3. Ct های بدست آمده برای هر یک از استانداردهای HBV 73

جدول 3-4 . کارایی PCR ، شیب نمودار منحنی استاندارد و R^2 مربوط به دقت سریال استانداردهای HBV ... 73

جدول 3-5 . Ct های بدست آمده برای هر یک از استانداردهای HTLV 75

جدول 3-6 . کارایی PCR ، شیب نمودار منحنی استاندارد و R^2 مربوط به رقت سریال استانداردهای HTLV 75
..... 77
جدول 3-7 . داده‌های Intra-assay مربوط به HTLV 77
جدول 3-8 . داده‌های Intra-assay مربوط به HBV 77
جدول 3-9 . داده‌های Intra-assay مربوط به HBV 78
جدول 3-10 . داده‌های Intra-assay مربوط به HTLV .....

فهرست شکل‌ها

شکل 1-1. ساختمان ویروس HTLV 3

شکل 1-2. چرخه زندگی HTLV 4

شکل 1-3. اشکال مختلف ویروس HBV 8

شکل 1-4. چرخه زندگی HBV 10

شکل 1-5. مکانیزم عمل Sandwich ELISA 12

شکل 1-6. مکانیزم عمل Western Bloting 13

شکل 1-7. مکانیزم عمل RT-PCR 16

شکل 1-8. مکانیزم عملSMART 18

شکل 1-9. مکانیزم عمل RT-SDA 18

شکل 1-10. مکانیزم عمل LAMP 20

شکل 1-11. مکانیزم عمل Bdna 21

شکل 1-12. مکانیزم عمل HAD 22

شکل 1-13. مکانیزم عمل NASBA 23

شکل 1-14. آشکار سازی بر پایه ساختار لیپوزومی 25

شکل 1-15. مکانیزم عمل PCR-ELISA 26

شکل 1-16. مکانیزم عملElectroChemiluminesence 27

شکل 1-17. نمودار تکثیر 28

شکل 1-18. منحنی استاندارد 30

شکل 1-19. مکانیسم عمل رنگهای فلوروسنت 31

شکل 1-20. شکل فضایی اتیدیوم برماید در بین دو رشته DNA 33

شکل 1-21. مکانیسم عمل پروبهایTaq Man 34

شکل 1-22. مکانیسم عمل پروبهای Hybridization 35

شکل 1-23. نمایی از شماتیک Molecular Beacon 35

شکل 1-24. مکانیسم عمل Scorpion Primer 35

شکل 1-25. مکانیسم عمل Light-up Probe 36
شکل 1-26. مکانیسم عمل Sunrise Primers 36
شکل 1-27. مکانیسم عمل Lux Primer 37
شکل 3-1. هم ردیفی توالی‌های ویروسHTLV-I با نرم افزار Mega 3.1 برای طراحی پرایمر 60
شکل 3-2. هم ردیفی توالی‌های ویروسHIV با نرم افزار Mega 3.1 برای طراحی پرایمر 60
شکل 3-3. هم ردیفی توالی‌های ویروسHBV با نرم افزار Mega 3.1 برای طراحی پرایمر 60
شکل 3-4. نمایی از پلاسمید pTZ57R\T موجود در کیت T/A coloning 61
شکل 3-5. Colony PCR رویHBV 62
شکل 3-6. Colony PCR روی HTLV-I و HIV 62
شکل 3-7. تخلیص پلاسمید نمونه HTLV-I وHIV 63
شکل 3-8. تخلیص پلاسمید نمونه HBV 63
شکل 3-9. نتیجه توالی یابی HTLV-I 64
شکل 3-10. نتیجه توالی یابیHBV 64
شکل 3-11. نتیجه توالی یابیHIV 64
شکل 3-12. منحنی Amlification و Melt ژنوم ویروس HBV ، Tm برابر 87 در حالت monoplex 65
شکل 3-13. منحنی Melt ژنوم ویروس HTLV-I ، Tm برابر 89 در حالت monoplex 66
شکل 3-14. بهینه‌سازی غلظت کلرید منیزیم برای واکنش Real-time SYBER Green1 برای دو ویروس HBV و HTLV 68
شکل 3-15. بهینه‌سازی غلظت کلرید منیزیم برای واکنش Real-time SYBER Green1 69
شکل 3-16. تفکیک قطعه هدف هر کدام از سه ویروس HBV و HTLV وHIV در واکنش Multiplex Real-time SYBER Green1 69
شکل 3-17. واکنش Real-tome PCR با پروب برای ویروس HBV در کانال FAM (بهترین غلظت3mM انتخاب شد) 70
شکل 3-18. واکنش Real-time PCR با پروب برای ویروسHTLV-Iدرکانال JOE (بهترین غلظت3mM انتخاب شد) 71

شکل 3-19. واکنش Multiplex Realtime PCR با پروب HBV جهت رسم منحنی استاندارد برای HBV در کانال FAM 72
شکل 3-20 منحنی استاندارد رسم شده برای HBV با استفاده از غلظت‌های معین هر استاندارد و Ct بدست آمده برای هر کدام 72
شکل 3-21. واکنش Multiplex Realtime PCR با پروب جهت رسم منحنی استاندارد برای HTLV در کانال JOE 74
شکل 3-22 . منحنی استاندارد رسم شده برای HTLV با استفاده از غلظت‌های معین هر استاندارد و Ct بدست آمده برای هر کدام 74
شکل3-22،بررسی اختصاصیت پرایمر ها و پروب ها..... 76

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

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، 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 ذیل را رعایت نمایند:

ماده 1 : حقوق مادی و معنوی پایان‌نامه‌ها / 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 2 : انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه / رساله به‌صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می‌باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

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

ماده 3 : انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان‌نامه / رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام می‌شود.

ماده 4 : ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه 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 حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده 5 : این دستورالعمل در 5 ماده و یک تبصره در تاریخ 1384/4/25 در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم‌الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل، از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

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

ماده 2 : در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته **بیوتکنولوژی پزشکی** است که در سال **1387** در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم** ، مشاوره **سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی** از آن دفاع شده است.

ماده 3 : 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 4 : در صورت عدم رعایت ماده 3، 50% بهای شمارگان چاپ شده را به‌عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تادیه کند.

ماده 5 : دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت 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 4 را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده 6 : اینجانب **وحید کیا** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی پزشکی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی

تاریخ و امضا

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان

توسعه یک Real-Time PCR چندگانه جهت تشخیص همزمان ویروسهای لوسمی سلولهای Tانسانی و ویروس هپاتیت B با استفاده از پروب‌های Molecular Beacon

نگارش

وحید کیا

استاد راهنما

دکتر مهدی فروزنده مقدم

استاد مشاور

دکتر فرزانه صباحی

بهار 1387

Development of a Quantitative Multiplex Real-Time PCR for Simultaneous Detection of HBV and HTLV-I by Molecular Beacon Probes

A Thesis
Presented for the
Master of Sciences Degree
In Medical Biotechnology

By: Vahid Kia

Supervisor: Dr. M. Forouzandeh Moghadam

Advisor: Dr. F. Sabahi

Tarbiat Modarres University
School of Medical Sciences

Spring 2008

تقدیم به :

پدر و مادر عزیزم

به پاس آن که : کوشش‌هایم را ستودند
از پیروزی‌هایم لذت بردند
و
عیب و نقص‌هایم را پذیرفتند.

خواهر مهربانم

که در سختی‌ها و مشکلات همواره یاور و مشفق من بوده و خواهد بود.

تشکر و قدردانی

با سپاس فراوان از جناب آقای دکتر مهدی فروزنده مقدم که راهنمایی‌های ایشان هدایت‌گر من در مسیر انجام این پایان‌نامه بود.

با تشکر از سرکار خانم دکتر فرزانه صباحی که از مشاوره‌های ایشان استفاده‌های بسیاری کردم.

همچنین از همیاری و هم‌فکری‌های جناب آقای عباسعلی راز، آقای مهدی پریان، آقای حمید آقایی، آقای محمود نادری، آقای کروندیان، کارشناس محترم گروه بیوتکنولوژی پزشکی، خانم دکتر رهبری‌زاده ، خانم رمضانی و خانم دکتر رجبی کمال تشکر و قدردانی می‌گردد.

فصل اول

مقدمه و

مروری بر مطالعات انجام شده

فصل دوم

مواد و روش‌ها

فصل سوم

نتایج

فصل چهارم

بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها