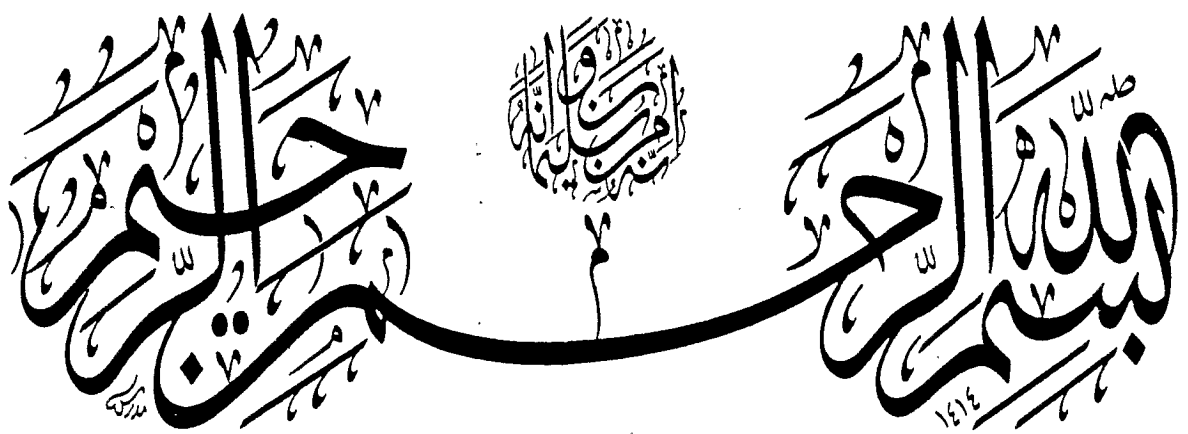

١٥ /٨/ ١٤٢٧هـ

١٠٢٩١٧

۸۷/۱/۱۰۲۸۲۹
۸۷/۱۱/۱۲

دانشگاه پیام نور تهران

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوشیمی

ارزیابی و آنالیز نوکلئوپروتئین استخراجی از ویروسهای انفلوانزای کشت شده در کشت سلولی MDCK و تخم‌مرغ جنین‌دار

مولف

یاسین پناهی

استاد راهنما

دکتر معصومه توسطی خیری

استاد مشاور

دکتر رضا صغیری

۱۳۸۷ /۸/ ۱۵

دیماه ۱۳۸۶

۱۰۲۹۱۷

دانشگاه پیام نور

تصویب نامه

پایان نامه تحت عنوان:

بررسی و آنالیز پروتئینهای NP تخلیص شده از ویروس آنفولانزا حاصل از کشت سلولی (MDCK) و تخم مرغ

تاریخ دفاع: ۸۶/۱۰/۳۰ **نمره:** ۱۹/۷۵ **درجه:** عالی

اعضای هیات داوران :

نام و نام خانوادگی	هیات داوران	مرتبه علمی	امضاء
۱. خانم دکتر معصومه توسطی خیری	استاد راهنمای اول		
۲. آقای دکتر رضا صغیری	استاد راهنمای دوم		
۳. آقای دکتر رضا حاجی حسینی	استاد داور داخلی		
٤. آقای دکتر بهزاد لامع راد	استاد داور خارجی		
۵. آقای دکتر حبیب اله ناظم	نماینده گروه		

حمد خدائی راکه اوّل بهر آثار هستی اوست و قبل از او اوّلی نبوده، و آخر است بی آنکه پس از او آخری باشد، خدائی که دیده بینندگان از دیدنش قاصر، و اندیشه و فهم وصف کنندگان از وصفش عاجز است. به دست قدرتش آفریدگان را ایجاد کرد، و آنان را براساس اراده خود صورت بخشید، آنگاه همه را در راه اراده خود راهی نمود، و در مسیر محبت و عشق به خود برانگیخت، موجودات هستی از حدودی که برای آنان معین فرموده قدمی پیش و پس نتوانند نهاد، و برای هریک از آنان روزی معلوم و قسمت شده‌ای از باب لطف قرار داد، هر آن کس را که روزی فراوان داده احدی نمی تواند بکاهد، و هر آن کس را که روزی کاسته هیچ کس نتواند بیفزاید، آنگاه زندگی او را زمانی معین مقدّر فرمود، و پایانی محدود قرار داد، که با ایام عمر به سوی آن پایان قدم برمی دارد، و با سالهای زندگیش به آن نزدیک میگردد، تا چون به آخر آن رسید، و پیمانه زمانش لبریز شد، جانش را می گیرد و او را به سوی آنچه بدان خدایش خواند یا از ثواب بسیار یا عذاب دردناک راهی می کند، تا از پی عدالت خود بدکاران را به کردار بدشان و نیکوکاران را به عمل صالحشان جزا دهد، منزّه است نام های او، و پی درپی است نعمت های وی، کسی را نرسد که او را از کرده‌اش باز پرسد، ولی همه در معرض پرسش او باشند. و سپاس خدای راکه اگر عبادش را از معرفت سپاسگزاری بر عطایای پیاپی که به آنان داده، و نعمت های پیوسته که بر ایشان کامل ساخته محروم می نمود نعمت هایش را صرف نموده و سپاس نمی گزاردند، و در روزی او فراخی می یافتند و شکر نمی کردند، و اگر چنین می بودند از حدود انسانیت بیرون شده به مرز حیوانیت می رسیدند، و چنان می بودند که در کتاب محکمش فرموده: «ایشان جز به چارپایان نمانند بلکه از آنان گمراه ترند.» سپاس خدای را بر آنچه از وجود مبارکش به ما شناسانده، و بر آنچه از شکرش به ما الهام فرموده، و بر آن درهای دانش که به پروردگاریش برما گشوده، و براخلاص ورزی در توحید و یگانگیش ما را رهنمون شده، و قلب ما را از الحاد و شک در کار خودش دور داشته، چنان سپاسی که با آن در حلقه سپاسگزاران از بندگانش زندگی بگذرانیم، و با آن بر هر که به خشنودی و بخشایش او پیشی جسته سبقت گیریم، سپاسی که تیرگیهای برزخ را به سبب آن بر ما روشن کند، و راه رستاخیز را به سبب آن برما آسان نماید، و موقعیت و جایگاه ما را نزد گواهان آن روز بلند گرداند، در روزی که همه سزای عمل خود بینند بدون آنکه بر کسی ستمی رود، روزی که هیچ دوستی چیزی از عذاب و کیفر را از دوست خود دفع نکند و ستمکاران یاری نشوند، سپاسی که از جانب ما در پرونده‌ای که وضع نیکبختان در آن رقم خورده و مقربان حضرت او گواهان آنند به اعلی علیین بالا رود، سپاسی که چون چشم ها در آن روز خیره شود سبب روشنی دیده ما گردد، و هنگامی که چهره ها سیاه شود صورت ما به نورانیت آن سپید گردد، سپاسی که ما را از آتش دردناک حق آزاد و در جوار کرم ناتمایش جای دهد، شویم و در پیشگاه عنایتش جای را بر ایشان تنگ کنیم، و به وسیله آن در سرای ماندگاری جاوید و جایگاه سرمدی او که دگرگونی نپذیرد به صف پیامبران مرسل او متصل گردیم. و سپاس خدای را با چه زبانی می توانیم شکرش را بجای آوریم؟ هیهات!...

برگرفته شده از دعای اول صحیفه سجادیه

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان من بوده و هستند

به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند...

تقدیم به برادرانم و خواهرم

محسن، حسین و سمیه

امیدهای زندگیم که وجودشان مایه دلگرمی من است...

تقدیر و تشکر می کنم از

سرکار خانم دکتر معصومه توسطی خیری استاد راهنمای عزیزم که مانند مادری فداکار مرا در همه امور کمک و یاری کردند و نادانسته های زندگی را به من یاد دادند

آقای دکتر رضا صغیری استاد مشاور عزیزم که مرا در اجرای این پروژه یاری کردند

اساتید عزیزم جناب آقای دکتر رضا حاج حسینی و آقای دکتر بهزاد لامع را که در بالابردن آموخته های من مرا کمک کردند

جناب آقای رسول سلیمانی استیار که مثل برادر بر منت گذاشته و از دانش و آموخته های خود مرا بهره مند ساختند

سرکار خانم بهرخ فرهمند که در بالابردن سطح علمی من مرا یاری کردند

همکاران عزیزم در بخش انفلوانزای انستیتو پاستور ایران جناب آقای دکتر روزبه بشری، سرکار خانم منصوره طباطبائیان، سرکار خانم دکتر وحیده مظاهری و سرکار خانم مهری راغبی که در همه حال کمک حال من بودند

دوستان عزیزم آقایان یونس پیله ور، عباس جمالی، و آرش قلیانچی و خانم ها زیبا سلطانی، مهسا شهیدی، پروانه مهرپد، الهام امینی، عفت علیزاده، لیلا ماهرخ، الهام آقامحمدی، نگار یعقوبی، تینا بلوریه بخاطر اینکه دوستی را در حق تکمیل کردند

آقایان حاج ابراهیم جوادی، حاج میراسماعیل سیدسالکی، حاج حسین بی الم و حاج میرفتاح سیاری بنیس در ستاد امداد و جهیزیه جمعیت اسلامی خیریه بنیس برای حسن همکاریشان در انجام این پروژه

شرکت فرهان بخاطر اهدای مواد و محلولهای مورد نیاز کمی لومینسانس که در این پروژه مورد استفاده قرار گرفتند.

عنوان | صفحه

فصل اول

۱-۱- مقدمه ۲

فصل دوم

کلیات

۲-۱- تاریخچه و طبقه بندی ۴

۲-۲- ساختمان و ترکیب ویروس ۷

۲-۳- چرخه همانندسازی ویروس انفلوآنزا ۸

۲-۴- سازمان ژنومی ویروس انفلوآنزا و پروتئینهای کد شده ۱۰

۲-۴-۱- پروتئین هماگلوتینین و ژن آن ۱۰

۲-۴-۲- پروتئین نورامینیداز و ژن آن ۱۲

۲-۴-۳- پروتئین ماتریکس و ژن آن ۱۲

۲-۴-۴- پروتئین NS و ژن آن ۱۴

۲-۴-۵- پروتئینهای پلیمرازی و ژن آن ۱۴

۲-۴-۶- نوکلئوپروتئین ۱۵

۲-۴-۶-۱- ساختمان و فعالیتهای نوکلئوپروتئین ویروس انفلوآنزا ۱۶

۲-۴-۶-۱-۱- فعالیت اتصال با اسیدریبونوکلئیک ۱۹

۲-۴-۶-۱-۲- تجمع مشابه نوکلئوپروتئین Homo oligomerization ۱۲

۲-۴-۶-۱-۳- میان‌کنش پلیمراز- نوکلئوپروتئین ۲۴

۲-۴-۶-۱-۴- میانکنش نوکلئوپروتئین با پروتئین M1 ماتریکس ۲۵

۲-۴-۶-۱-۵- میانکنش نوکلئوپروتئین با ایمپورتین α ۲۷

۲-۴-۶-۱-۶- میانکنش نوکلئوپروتئین با F- اکتین ۲۹

۲-۴-۶-۱-۷- میانکنش نوکلئوپروتئین با CRM1 ۲۹

عنوان	صفحه
۲-۴-۶-۱-۸- میانکنش NP-BAT1/UAP56	۳۰
۲-۴-۶-۱-۹- میانکنش نوکلئوپروتئین با Karyopherin αها (NPI-1/NPI-3)	۳۱
۲-۴-۶-۲- نقش نوکلئوپروتئین در طی چرخه حیات ویروس	۳۱
۲-۵- پیشگیری ودرمان	۳۵
۲-۵-۱- داروهای ضد ویروسی	۳۵
۲-۵-۲- واکسن ها	۳۵
فصل سوم	
مواد و روش ها	
۳-۱- ویروس	۴۱
۳-۲- تغلیظ ویروس حاصل از تکثیر در دو محیط کشت	۴۱
۳-۲-۱- تغلیظ و تخلیص ویروس انفلوآنزا از مایع الانتوئیک تخم مرغ های تلقیح شده	۴۱
۳-۲-۱-۱- مواد و وسایل مورد نیاز	۴۱
۳-۲-۱-۲- روش کار	۴۲
۳-۲-۲- تغلیظ و تخلیص ویروس انفلوآنزا از کشت سلولی MDCK	۴۴
۳-۳- تعیین غلظت پروتئین	۴۴
۳-۳-۱- روش اصلاح شده لوری: پترسون	۴۵
۳-۳-۱-۱- وسایل مورد نیاز	۴۵
۳-۳-۱-۲- محلولهای مورد نیاز	۴۵
۳-۳-۱-۲-۱- تهیه محلول C.T.C	۴۶
۳-۳-۱-۲-۲- تهیه محلولA	۴۶
۳-۳-۱-۲-۳- تهیه محلول B	۴۶
۳-۳-۲- روش کار	۴۷

عنوان	صفحه
۳-۳-۳- چند نکته مهم در مورد روش لوری	۴۹
۳-۴- استخراج پروتئینهای مرکزی ویروس انفلوانزا	۵۰
۳-۴-۱- وسایل و مواد لازم	۵۰
۳-۴-۲- بافر TES pH 7.4	۵۰
۳-۴-۲-۱- روش تهیه TES buffer	۵۰
۳-۴-۳- بافر استخراج Extraction buffer pH 7.4	۵۱
۳-۴-۳-۱- روش تهیه بافر استخراج	۵۱
۳-۴-۲- روش استخراج RNP	۵۱
۳-۵- تست هماگلوتیناسیون (Haemagglutination test) HA assay	۵۵
۳-۵-۱- وسایل و مواد لازم	۵۵
۳-۵-۲- روش کار	۵۵
۳-۶- SDS-PAGE و Western Blot	۵۶
۳-۶-۱- SDS-PAGE	۵۶
۳-۶-۱-۱- مواد و وسایل مورد نیازبرای SDS-PAGE	۵۷
۳-۶-۱-۲- روش انجام SDS-PAGE	۵۷
۳-۶-۱-۳- محلولهای مورد استفاده در الکتروفورز SDS-PAGE	۵۸
۳-۶-۱-۳-۱- بافر نمونه	۵۸
۳-۶-۱-۳-۲- بافر ۱,۵ M برای ژل Resolving یا Separating	۵۹
۳-۶-۱-۳-۳- بافر ۰,۵ M برای ژل Stacking	۵۹
۳-۶-۱-۳-۴- SDS-PAGE running buffer	۵۹
۳-۶-۱-۳-۵- تهیه اکریل آمید و بیس اکریل آمید ۳۰٪	۵۹
۳-۶-۱-۳-۶- رنگ کوماسی بلو ۰,۰۵ ٪	۶۰

عنوان	صفحه
۳-۶-۲- وسترن بلات	۶۰
۳-۶-۲-۱- مواد و وسایل مورد نیاز برای Western blot	۶۰
۳-۶-۲-۲- محلولهای مورد نیاز برای وسترن بلات	۶۰
۳-۶-۲-۲-۱- بافر بلوتینگ Blotting buffer	۶۰
۳-۶-۲-۲-۲- بافر PBS با pH: 7.2	۶۱
۳-۶-۲-۲-۳- محلول پانسواس Panceau S	۶۱
۳-۶-۲-۳- روش انجام Western blotting	۶۲
۳-۶-۲-۳-۱- انتقال یا ترانسفرکردن پروتئینها از ژل به غشاء نیتروسلولز	۶۲
۳-۶-۲-۳-۲- مشاهده باندهای پروتئینی	۶۲
۳-۶-۲-۳-۳- واکنشهای روشنگر حضور NP	۶۳
۳-۶-۲-۳-۳-۱- به کمک TMB یا DMB	۶۳
۳-۶-۲-۳-۳-۲- با روش کمی لومینسانس Chemiluminescence	۶۳
۳-۶-۲-۴- نکاتی که در هنگام وسترن بلات باید مورد توجه قرار گیرد	۶۵
۳-۷- تغلیظ به روش TCA-Acetone	۶۶
۳-۷-۱- مواد و وسایل مورد نیاز	۶۶
۳-۷-۲- روش کار	۶۶
۳-۸- تعیین غلظت پروتئین به روش برادفورد	۶۷
۳-۸-۱- شیمی روش برادفورد	۶۷
۳-۸-۲- مواد و وسایل مورد نیاز	۶۷
۳-۸-۳- روش کار	۶۸
۳-۹- الکتروفورز دوبعدی	۶۸
۳-۹-۱- مواد و وسایل مورد نیاز	۶۹

عنوان	صفحه
۳-۹-۲- روش کار	۶۹
۳-۹-۲-۱- ایزوالکتریک فوکوسینگ (IPG)	۷۰
۳-۹-۲-۲- الکتروفورز SDS-PAGE	۷۰

فصل چهارم

نتایج

۴-۱- تعیین تیتر ویروس به روش Hemagglutination assay	۷۳
۴-۲- غلظت پروتئین ویروسی برای تعیین مقادیر مورد نیاز از بافر استخراج و OCG	۷۳
۴-۲-۱- تعیین غلظت پروتئین ویروس محیط کشت سلولی MDCK	۷۳
۴-۲-۲- تعیین غلظت پروتئین ویروس برای محیط تخم مرغی	۷۵
۴-۳- نتایج الکتروفورزSDS-PAGE	۷۶
۴-۴- نتایج مربوط به وسترن بلاتینگ	۷۸
۴-۴-۱- استفاده از پلی کلونال آنتی بادی ضد ویروس انفلوانزا بعنوان آنتی بادی اولیه	۷۸
۴-۴-۲- استفاده از مونوکلونال آنتی بادی ضد نوکلئوپروتئین بعنوان آنتی بادی اولیه	۷۹
۴-۵- نتایج مربوط به ECL (Enhanced Chemilumiescence)	۸۰
۴-۶- نتایج مربوط به ایزوالکتریک فوکوسینگ IEF	۸۱
۴-۷- نتایج مربوط به الکتروفورز دو بعدی two dimensional ریبونوکلئوپروتئینهای استخراج شده	۸۱
۴-۷-۱- الگوی الکتروفورز دوبعدی از ریبونوکلئوپروتئینهای استخراج شده از ویروس های کشت داده شده بر روی جنین ۱۱ روزه مرغ	۸۲
۴-۷-۲- الگوی الکتروفورز دوبعدی ریبونوکلئوپروتئینهای استخراج شده از ویروسهای کشت داده شده بر روی محیط کشت سلولی MDCK	۸۳

فصل پنجم

عنوان	صفحه
بحث و نتیجه گیری	۸۶
فصل ششم	
منابع	۹۱

فهرست جداول

جدول ۲-۱- تفاوت میان ارتومیکسوویروسها و پارا میکسوویروسها ۵

جدول ۲-۲- ویژگی ژنوم ویروس آنفلوآنزای A و پروتئین های کد شده توسط قطعات ژنوم، ۱۰

جدول ۲-۳- میان‌کنش نوکلئوپروتئین (NP) با تنوع وسیعی از ماکرومولکولهای ویروسی و سلولی ۱۹

جدول ۲-۴- تعدادی از واکسنهای جدید پیشنهاد شده برعلیه ویروس انفلوآنزا ۳۸

جدول ۴-۱- مقادیرخام جذب خوانده شده توسط دستگاه ELISA reader Anthos 2020 در ۶۲۰ نانومتراز نمونه کشت سلولی ۷۳

جدول ۴-۲- مقادیر خام جذب خوانده شده توسط دستگاه ELISA reader Anthos 2020 در ۶۲۰ نانومتر از نمونه کشت تخم مرغی ۷۵

اختصارات علمی

NP	Nucleocapsid
M	Matrix
HA	Hemagglutinin
NA	Neuraminidase
HEF	Haemaglutinin – Esterase - Fusion Protein
NS	None Structural
RNP	Ribonucleoprotein
Arm	Armadillo
NES	Nuclear Export Signal
CRM	Cellular nuclear export receptor
RAF	RNA-Polymerase activating factor
LMB	Leptomycin B
NLS	Nuclear Localization Signal
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte
HA assay	Hemagglutination assay
PBS	Phosphate buffer Saline
MDCK	Madin Darby Canine Kidney Cell
ECE	Embryonated Chicken Egg
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
BSA	Bovine Serum Albumin
OCG	Octyl Glucopyranosid
RBC	Red Blood Cell
SDS-PAGE	SDS- Poly Acrylamid Gel Electrophoresis
2-ME	β- Mercapto Ethanol
WB	Western Blotting
ECL	Enhanced Chemilumiescence
HRP	Horse Radish Proxidase
IEF	Isoelectic Focusing
DTT	dithiothreitol
APS	Ammonium persulfate

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- دو نمونه ازساختار سه بعدی ویروس انفلوانزا و همچنین هشت قطعه ژنومی به صورت مجزا ۶

شکل ۲-۲- نمایش ورود ویروس به سلول میزبان و چگونگی تکثیر ویروس در داخل سلول میزبان ۸

شکل ۲-۳- مدلی برای سنتز اسیدریبونوکلئیک (mRNA)(رونوشت برداری) رشته مثبت ویروس انفلوانزا ۹

شکل ۲-۴- ساختار مونومر هماگلوتینین و نواحی شناخته شدهٔ متصل شونده به آنتی بادی ۱۱

شکل ۲-۵- مراحل چسبیدن ویروس به غشاء سلول میزبان با واسطه HA ۱۱

شکل ۲-۶- فعالیت کانال یونی پروتئین M2 برای ورود ویروس و تفکیک میان‌کنش پروتئین- پروتئین ۱۳

شکل ۲-۷- نواحی عملکردی نوکلئوپروتئین (NP) ۱۶

شکل ۲-۸- سازماندهی ساختمانی ریبونوکلئوپروتئینهای (RNP) ویروس انفلوانزا. ساختمان بازسازی شده با رزولوشن ۲۷
آنگستروم mini-RNP های نوترکیب (a) و ساختار اتمی مونومر نوکلئوپروتئین(b) ۱۸

شکل ۲-۹- نمایش شماتیک واکنشهای بازهای نوکلئوتیدی در مکانهای واتسون- کریکی: روی ۸۱ نوکلئوتید مدل RNA:
شکل بالا کمپلکس RNA-NP را نشان می دهد ۲۰

شکل ۲-۱۰- شکل بازسازی شده نمایش اتصال پلیمراز با نوکلئوپروتئین ۲۵

شکل ۲-۱۱- مقایسه دومینهای arm ایمپورتین α انسانی: A: ارتباط نشان داده شده میان شش ایمپورتین α انسانی. B: نمایش
نواری دومینهای arm ایمپورتین α مخمر و شکلC: هم ترازی و دندروگرامی که با برنامه PILEUP ساخته شده وبا نرم
افزار GCG بسته بندی شده است ۲۷

شکل ۲-۱۲- مدل کارتونی سازمان ریبونوکلئوپروتئین ۳۲

شکل ۲-۱۳- نقش نوکلئوپروتئین در سنتز cRNA: در نظریه « مادیفیکاسیون پلیمراز» میانکنش پروتئین- پروتئین میان
نوکلئوپروتئین ۳۳

شکل ۲-۱۴- رفت وآمد نوکلئوپروتئین ویروس انفلوانزا ۳۴

عنوان	صفحه

۳-۱- مثالی از تست هماگلوتیناسیون HA assay ۵۶

۳-۲- طریقه جاگذاری ژل و غشاء نیتروسلولوز در کاست وسترن بلات ۶۲

شکل ۴-۱-SDS-PAGE 10% برای بررسی نوکلئوپروتئینهای استخراج شده از هردو محیط کشت سلولی MDCK و تخم مرغی با رنگ آمیزی کوماسی سیلوربلو G250 ۷۶

شکل ۴-۲- SDS-PAGE 12%: نوکلئوپروتئین ویروس آنفولانزا پس از استخراج با استفاده از غلظتهای مختلف نمک بافر استخراج. رنگ آمیزی با روش نیترات نقره ۷۷

شکل ۴-۳- SDS-PAGE 12% : نوکلئوپروتئین استخراجی و ویروس کامل در محیط کشت تخم‌مرغی ۷۷

شکل ۴-۴- SDS-PAGE 12% : نوکلئوپروتئینهای استخراجی از محیط کشت سلولی MDCK و محیط کشت تخم مرغی ۷۸

شکل ۴-۵- وسترن بلات با آنتی بادی پلی کلونال ضد ویروس انفلوانزا. ۷۹

شکل ۴-۶- وسترن بلات با آنتی بادی مونوکلونال ضد نوکلئوپروتئین ۷۹

شکل ۴-۷- وسترن بلات با آنتی بادی مونوکلونال ضد نوکلئوپروتئین ۸۰

شکل ۴-۸- ظاهر سازی باند اختصاصی مربوط به نوکلئوپروتئین استخراجی به روش کمی لومینسانس ۸۰

شکل ۴-۹- ایزوالکتریک فوکوسینگ بر روی استریپهایی با pI بین ۱۰-۳ ۸۱

شکل ۴-۱۰- الکتروفورز دوبعدی نوکلئوپروتئینهای استخراج شده از کشت تخم مرغی ۸۲

شکل ۴-۱۱- آنالیز نقاط مشترک محیط کشت تخم مرغی توسط آنالیزر ژل دوبعدی a. نقطه ۵۹۳ و b. نقطه ۵۹۷با نرم افزار Progenesis-200 ۸۳

شکل ۴-۱۲- الکتروفورز دوبعدی ازنوکلئوپروتئینهای استخراج شده از کشت سلولی MDCK ۸۳

شکل ۴-۱۳- آنالیز نقاط مشترک محیط کشت سلولیMDCK توسط آنالیزر ژل دوبعدی a. نقطه ۵۹۳ و b. نقطه ۵۹۷با نرم افزار Progenesis-200 ۸۴

چکیده

بیماریهای تنفسی دردنیا بیش از نیمی از موارد بیماریهای حاد را تشکیل می‌دهند. در این میان ویروس های خانواده ارتومیکسوویریده[1] شامل ویروسهای انفلوآنزا، عامل عمده‌ای در ایجاد بیماری و مرگ و میر ناشی از بیماریهای تنفسی به حساب می‌آیند. موارد عفونت گاهی به طور همه‌گیری در سراسر جهان انتشار می‌یابد. ویروس انفلوآنزا، عامل بیش از میلیونها مورد مرگ در سراسر جهان در طی قرن اخیر بوده است. به علت خاصیت جهش زایی و فراوانی بازآرائی (نوترکیبی)[2] در ارتومیکسوویروسها، که موجب تغییرات عمده آنتی‌ژنی در گلیکوپروتئین‌های سطحی ویروس می‌شود، ویروسهای انفلوآنزا در برابر اقدامات پیشگیری، مقاومت می‌کنند. این ویژگی، یکی از اختصاصات اپیدمیولوژیکی ویروس انفلوآنزا است که مشکلات عمده‌ای را جهت توسعه واکسن فراهم می‌سازد. بنابراین برای جلوگیری از همه گیری ویروس انفلوانزا سازمان بهداشت جهانی همه ساله براساس گزارش های مراکز آزمایشگاهی خود در سرتاسر جهان در مورد ویروس شایع، واکسن جدید را طراحی می کند. این واکسن عمدتا موجب القاء آنتی بادی علیه هماگلوتینین (HA)،گلیکوپروتئینی که باعث اتصال ویروس به سطح سلولهای میزبان می شود، میگردد. ایده جدید برای تولید واکسن استفاده از پروتئینهای غیرگلیکوزیله داخلی ویروس مانند ماتریکس (M) و نوکلئوپروتئین (NP) می باشد که در طول سالیان متمادی کمتر دچار تغییر و یا موتاسیون شده اند. در این میان نوکلئوپروتئین که توسط قطعه شماره ۵ اسیدریبونوکلئیک ویروسی رمزگشایی می شود توجه بیشتر دانشمندان را به خود جلب کرده است. این پروتئین باعث پوشش گذاری RNA ویروسی و در نتیجه مانع تجزیه های آنزیمی می شود. همچنین نشان داده شده است که نوکلئوپروتئین تحت تاثیر سیستم مورد استفاده در کشت قرار می گیرد یعنی وابسته به محیط کشت[3] می باشد.

در این تحقیق سعی شده است پروتئین استخراج شده نوکلئوپروتئین از دو محیط کشت سلولی پستانداران MDCK و تخم مرغ جنین‌دار (Embryonated Chicken Egg) از لحاظ حرکت الکتروفورتیکی برروی ایزوالکتریک فوکوسینگ[4] (IEF) و همچنین الگوی پروتئینی رسوبهای استخراج شده از دو محیط بر روی الکتروفورز دوبعدی با همدیگر مورد مقایسه قرار داده شود.

---

[1] Orthomyxoviridae
[2] Genetic reassortment
[3] Host-Specifiucity
[4] Isoelectric focusing

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

انفلوانزا که عموماً بنام فلو[1] هم نامیده می‌شود یک بیماری عفونی پرندگان و پستانداران است که توسط ویروسهای RNAدار ازخانواده ارتومیکسوویریده ایجاد می شود. در انسانها دارای عوارضی از قبیل تب، درد عضلانی، سردرد شدیدو ... می شود. این ویروس سالیانه بواسطه تغییراتی که در گلیکوپروتئینهای غشایی اش رخ می دهد باعث مرگ و میرهای فراوانی در سطح جهان می شود و بخاطر همین تغییرات، ایمنی درازمدتی نمی تواند کسب شود بنابراین سازمان بهداشت جهانی براساس گونه های شایع در جهان واکسن علیه آن را براساس گلیکوپروتئینهای آن، سالیانه طراحی می کند. یکی از روشهای جدید طراحی جدید واکسن علیه این ویروس استفاده از پروتئینهای محافظت شده داخلی ویروس (نوکلئوپروتئین) می باشد. بخاطر اینکه نوکلئوپروتئین در بین گونه های مختلف ویروس انفلوانزا محافظت شده تر است بنابراین با فرموله کردن آن در واکسنهای زیرواحدی طراحی شده می توان واکسن موثرتری علیه این ویروس بدست آورد.

[1] Flu