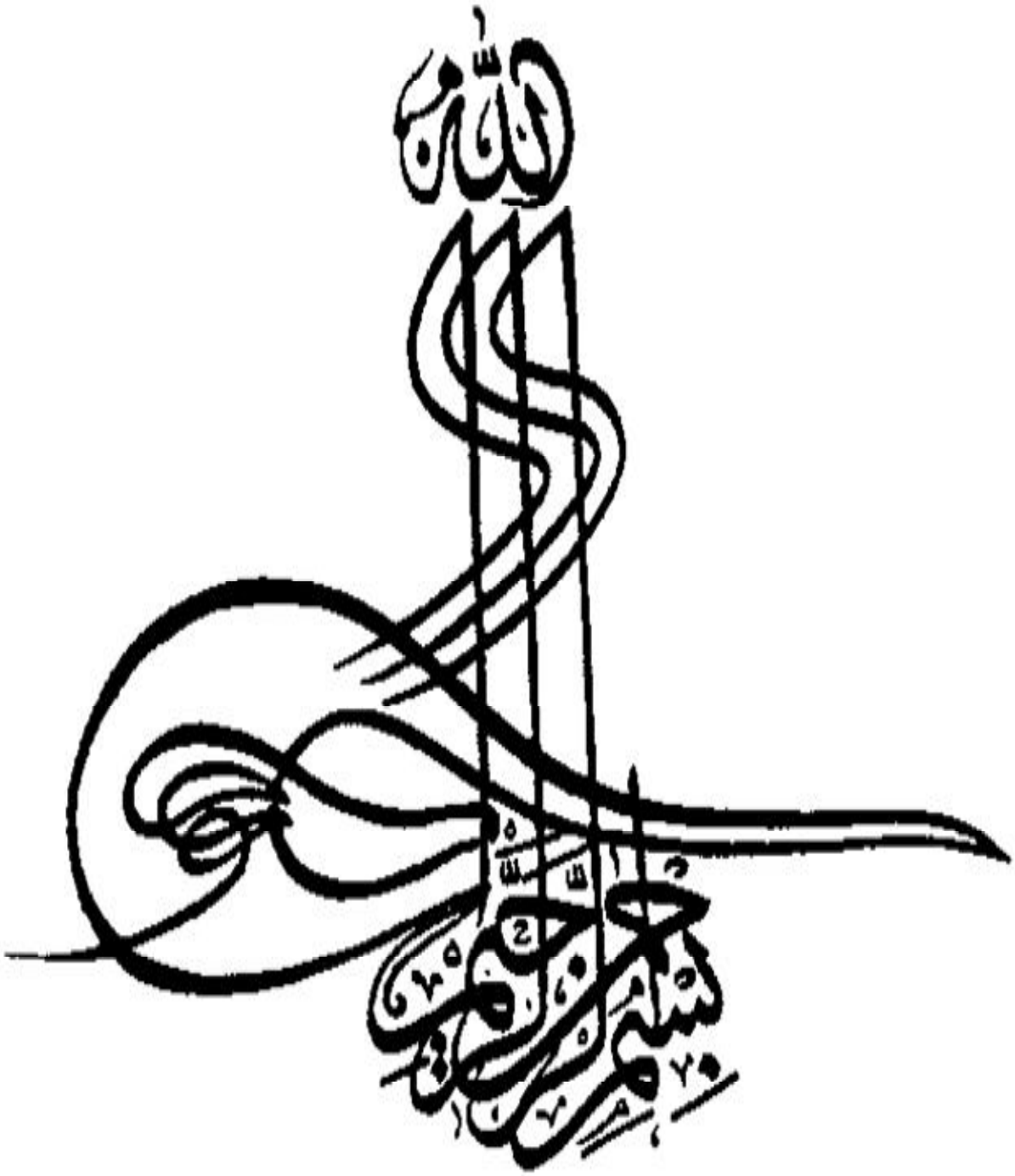


دانشکده زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی گرایش میکروبیولوژی

عنوان:

جدا سازی انولوپ ویروس انفلوانزا بوسیله حذف ابزار درون آن به منظور کاربرد آن در تولید نانو پارتیکلهای وایروزومی

اساتید راهنما:

خانم دکتر شیرین قربانی

خانم دکتر معصومه توسطی خیری

دانشجو:

مهری نوری

شهریور ۱۳۹۰

دانشکده زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی گرایش میکروبیولوژی

عنوان:

جدا سازی انولوپ ویروس انفلوانزا بوسیله حذف ابزار درون آن به منظور کاربرد آن در تولید نانو پارتیکلهای وایروزومی

اساتید راهنما:

خانم دکتر شیرین قربانی

خانم دکتر معصومه توسطی خیری

استاد مشاور:

دکتر عباس جمالی

دانشجو:

مهری نوری

شهریور ۱۳۹۰

کلیه دستاوردهای این تحقیق متعلق به دانشگاه الزهرا(س) است.

تقدیم به :

خدایی که آفرید

جهان را، انسان را، عقل را، علم را، معرفت را، عشق را

و به کسانی که عشقشان را در وجودم دمید

تقدیم به پدر بزرگوار و مادر مهربانم :

آن دو فرشته ای که از خواسته هایشان گذشتند، سختی ها را به جان خریدند و خود را سپر بلای مشکلات و ناملایمات کردند تا من به جایگاهی که اکنون در آن ایستاده ام برسم .

و تقدیم به برادر و خواهر مهربانم :

لبخند شیرینشان بهترین دلگرمی برای ادامه راهم بود .

سپاس بی کران خداوند یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و معرفت رهنمونمان شد.

اکنون بر خود لازم می دانم سپاسگزار تمام عزیزانی باشم که در به ثمر رسیدن ارزشمند ترین تجربه زندگی ام یاریم نمودند.

مراتب تشکر و قدردانی صمیمانه خود را از اساتید راهنما، سرکار خانم دکتر شیرین قربانی و سرکار خانم دکتر معصومه توسطی خیری به پاس زحمات بی دریغ و رهنمود های ارزشمندشان ابراز می دارم.

با سپاس فراوان از جناب آقای دکتر عباس جمالی، استاد مشاور پایان نامه که از راهنمایی و مساعدت ایشان همواره بهره مند بودم.

همچنین از دوستان عزیز و همکاران خوب و صمیمی واحد آنفلوانزای انستیتو پاستور ایران و اساتید گرامی دانشگاه الزهرا که مرا در انجام این تحقیق یاری نمودند، بسیار سپاسگزارم.

چکیده :

ویروس آنفلوانزا یکی از مهمترین عوامل عفونی ایجادکننده بیماری در سطوح مختلف تا حد بروز مرگ و میر در سراسر جهان است . واکسن تجاری آنفلوانزا که به طور سالیانه بر اساس ویروس غالب در گردش طراحی میشود تنها قادر به ایجاد حفاظت نسبی در جامعه می باشد.

ویروس آنفلوانزا به عنوان یکی از عوامل پاندمی های آنفلوانزا در سال‌های زیادی شناخته شده است که این ویروس دارای غلاف حاوی گلیکو پروتئین هایی با خاصیت آنتی ژنیک میباشد که دور هسته حاوی نوکلئو پروتئین و ژنوم از جنس RNA منفی و چند پروتئین داخلی را پوشانده است.

وایروزوم‌های آنفلوانزا وزیکول‌های غشایی ایی هستند که اسپایک‌های پروتئینی ویروس (هماگلوتینین و نورامینیداز) را حمل میکنند.

وایروزومها ابداعات جدیدی هستند که به عنوان ادجوانت و سیستمهای حامل، در تهیه واکسن هایی بر پایه آنتی ژن مورد استفاده قرار گرفته اند. تکنولوژی وایروزومی در درمان بیماریهای ناشی از عفونت ها و سرطانها و در جهت گسترش تکنولوژی ساخت واکسن کاربردهای فراوانی دارد. استفاده از واکسن های وایروزومی در افزایش القاء پاسخ ایمنی بر علیه این بیماریها بصورت کارائی استفاده شده و میشود. این ساختارها بدلیل مشابهت به غشاء سلولی سمیت و ضرری ندارند.

در این تحقیق چگونگی ساخت وایروزوم با کاربرد ویروس آنفلوانزای A/PR8/(H1N1) بهینه سازی گردیده است. پس از تکثیر و ازدیاد ویروس، آن را تخلیص نموده و پس از حذف ژنوم و پروتئین های هسته، با ایجاد شرایط بهینه به شکل وزیکولهای خالی به نام وایروزوم سر هم بندی گردیدند.

مزیت این وایروزوم بر وایروزوم هایی که قبلا تهیه شده اند اینست که قابل دیالیز بوده و میتوان برای حذف دترجنت آن را دیالیز کرد و شاهد بازسازی مجدد غشای ویروس آنفلوانزا بود. سپس با استفاده از میکروسکوپ الکترونی ذرات بازسازی شده ویروسی را، میتوان مشاهده کرد.

واژگان کلیدی : ویروس آنفلوانزا ی A (H1N1) ، وایروزوم، دترجنت DCPC

فهرست مطالب :

وایروزوم‌های آنفلوانزا در تهیه و گسترش واکسن 1

۱-۱-فصل اول: مقدمه.....1

فصل دوم: تاریخچه و پیشینه پژوهش 7

۲-۱- طبقه‌بندی 7

۲-۲- ساختار ویریون 8

۲-۳- ساختار ژنومی ویروس انفلوانزا و پروتئین‌ها ی رمز گذاری شده توسط آن 10

۲-۳-۱- پروتئین های پلی مراز و ژن آن..... 10

۲-۳-۲- پروتئین نوکلئوکپسید و ژن آن 10

۲-۳-۳- پروتئین هماگلوتینین و ژن‌های آن..... 11

۲-۳-۴- پروتئین نورآمینیداز و ژن آن 12

۲-۳-۵- پروتئین های M_1،M_2 و ژن آنها..... 13

۲-۴- پروتئین های Non-Structural NS_1،NS_2 (غیر ساختاری)و ساختار ژنی آن ها 14

۲-۴-۱- پروتئین NS_1..... 14

۲-۴-۲- پروتئین NS_2..... 14

۲-۵- مراحل تکثیر و همانند سازی ویروس انفلوانزا 15

۲-۵-۱- جذب، ورود و بدون پوشینه شدن ویروس 15

۲-۵-۲- سنتز mRNA و همانند سازی RNA ویروسی..... 16

۲-۵-۳- تنظیم بیان ژن‌های ویروسی در سلول های آلوده 18

۲-۵-۴- جوانه زدن و بسته‌بندی ویروس..... 18

۲-۶- ژنتیک ویروس انفلوانزا 19

۲-۷- عملکرد دستگاه ایمنی بر علیه انفلوانزا 20

۱-۷-۲-ایمنی ذاتی 20
۲-۷-۲- ایمنی اکتسابی 21
۸-۲- آسیب شناسی 23
۹-۲- علائم بالینی 23
۱۰-۲- وایروزوم ها: 24
۱۱-۲- واکنش وایروزوم‌ها با سیستم ایمنی: 25
پیشینه :..... 27
۱۲-۲- شناسایی ویروس 27
۱-۱۳-۲- روش های تشخیص ویروس انفلوانزا 28
۱۴-۲- آزمون هماگلو تیناسون و مهار هماگلوتیناسیون 29
۱۵-۲- آزمون نورامینیداز و مهار نورامینیداز 30
۱۶-۲- واکسن انفلوانزای انسانی 31
۱-۱۶-۲- واکسن غیر فعال شده 31
۲-۱۶-۲- واکسن زنده تخفیف حدت یافته 32
۱۷-۲-انتخاب سالیانه سویه های واکسن انفلوانزای انسانی 33
۱۸-۲- کارایی واکسن 33
۱۹-۲- استفاده از ادجوانت‌ها 34
۲۰-۲- واکسن‌های ژنی 34
۲۱-۲- تولید واکسن بدون نیاز به تغییرات هر ساله 36
۲۲-۲- کاربرد ادجوانت 36
۲۳-۲- داروهای ضد انفلوانزا 37
۱-۲۳-۲- داروهای آمانتادین و ریمانتادین 37

۲-۲۳-۲- زانامیویر 37

۳-۲۳-۲- اوسلتامیویر 38

۲۴-۲- تهیه سازی و مشخصات وایروزوم‌های آنفلوانزا 38

۲۵-۲- فعالیت فیوژنی : 40

۲۶-۲- کاربردهای وایروزومهای آنفلوانزا برای اهداف ایمنی سازی :..... 40

۱-۲۶-۲- آنتی بادی ها : 40

۲-۲۶-۲- وایروزومها به عنوان سیستم انتقالی برای آنتی ژن‌های غیر مرتبط :..... 41

۳-۲۶-۲- تحریک پاسخ های سیتوتوکسیک لنفوسیت‌های T :..... 42

فصل سوم: مواد و روشها

۱-۳- ویروس مورد استفاده :..... 44

۲-۳- محیط کشت سلول 44

۳-۳- طرز تهیه محیط کشت DMEM :..... 45

۴-۳- طرز تهیه محلول Phosphate Buffer Saline (PBS) برای شستشو:..... 45

۵-۳- طرز تهیه محلول Trypsin-EDTA (10 x) :..... 46

۶-۳- طرز تهیه محلول آلسورز :..... 46

۷-۳- طرز تهیه سوسپانسیون 0.5 درصد گلبول قرمز :..... 47

۸-۳- طرز تهیه بافر HEPES Buffer Saline (HBS) 10X برای اولتراسانتریفیوژ:..... 47

۱-۸-۳- وسایل و ملزومات مورد نیاز برای ساخت سوکروز ۱۰ و ۶۰ درصد :..... 47

۹-۳- طرز تهیه محلول استاندارد Bovin Serume Albumin (BSA) 0.02 mg/ml برای سنجش پروتئین :..... 48

۱-۹-۳- طرز تهیه معرف Lowry :..... 48

۲-۹-۳- طرز تهیه معرف فولین : 48

۱۰-۳- آماده سازی سلولهای MDCK جهت تلقیح ویروس :..... 49

۳-۱۱- تکثیر ویروس بر روی کشت سلولی : 50

۳-۱۲- تعیین عیار ویروس به روش $TCID_{50}$: 51

۳-۱۳- آزمایش هماگلوتیناسیون (HA): 52

۳-۱۴- جمع آوری ویروس : 54

۳-۱۵- تغلیظ ویروس : 54

۳-۱۶- تخلیص ویروس با استفاده از شیب سوکروز : 55

۳-۱۷- خارج نمودن سوکروز از سوسپانسیون ویروسی: 56

۳-۱۸- تهیه وایروزوم :..... 56

۳-۱۹- سنجش میزان پروتئین وایروزوم (تست Lowry): 57

۳-۲۰- تایید حضور HA در وایروزوم با SRID :..... 60

۳-۲۰-۱- تزریق به خرگوشها : 60

۳-۲۰-۲- پروتکل تزریق : 62

۳-۲۰-۳- انجام تست SRID :..... 62

۳-۲۱- رنگ آمیزی نمونه جهت مشاهده با استفاده از ترانس الکترون میکروسکوپی (TEM) : 65

۳-۲۲- تست مهار هماگلوتیناسیون (HI)..... 66

۳-۲۳- ارزیابی پروتئین های موجود در نمونه: 67

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- تست HA : 73

۴-۲- تعیین عیار عفونت زایی ویروس ($TCID_{50}$) : 74

۴-۳-تغلیظ ویروس 75

۴-۴- تخلیص ویروس با استفاده از شیب سوکروز :..... 76

۴-۵- سنجش میزان پروتئین در وایروزوم: 77

۴-۶- سنجش حضور HA در وایروزوم با SRID : 78

۴-۷- مشاهده وایروزوم توسط میکروسکوپ الکترونی با روش TEM : 79

۴-۸- تست HI : 80

۴-۹- ارزیابی بیان پروتئین های موجود در وایروزوم با SDS-PAGE : 81

فصل پنجم: بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات

۵-۱- بحث : 83

۵-۲- پیشنهادات : 87

منابع :

Refrences : 88

Abstract :.....97

فهرست تصاویر :

شکل ۱-۲- پاندمی های انفلوانزا.....6

شکل ۲-۲ ساختار ویروس انفلوانزا 8

شکل ۳-۲ ساختار ژنومی ویروس انفلوانزا 10

شکل ۴-۲ مراحل تکثیر ویروس انفلوانزا.....15

شکل ۵-۲- تصویری از واکنش بین وایروزومها با سیستم ایمنی میزبان.....27

شکل ۶-۲- هماگلوتیناسیون ویروس انفلوانزا 29

شکل ۱-۳- سری رقتهای ویروس مجاور شده با RBC ۰/۵ درصد 53

شکل ۱-۴- تست HA.....73

شکل ۳-۴- تغلیظ ویروس با اولترافیلتراسیون 75

شکل ۴-۴- تخلیص ویروس با استفاده از شیب سوکروز 76

شکل ۶-۴- سنجش حضور HA در وایروزوم با SRID 78

شکل ۷-۴- مشاهده وایروزوم توسط میکروسکوپ الکترونی با روش TEM.....79

شکل ۸-۴- تست HI.....80

شکل ۹-۴- ارزیابی بیان پروتئین های موجود در وایروزوم با SDS-PAGE 81

فهرست جداول :

جدول ۱-۳- تهیه رقتهای مختلف محلول استاندارد BSA 59

جدول ۲-۳- تهیه رقتهای مختلف ویروسی 59

جدول ۳-۳- تزریق به خرگوشها 61

جدول ۴-۳- نحوه تهیه رقتهای آنتی ژن رفرنس و ویروس غیر فعال شده 64

جدول ۵-۳-ژل پلی اکریل آمید ۱۲٪ با حجم ۴۰ ml : 69

جدول ۲-۴- تعیین عیار عفونت زایی ویروس ($TCID_{50}$).....74

جدول ۱-۵-۴- OD نمونه های استاندارد BSA در ۷۵۰ نانومتر 74

جدول ۲-۵-۴- OD خوانده شده نمونه های ویروسی.....74

فصل اول

مقدمه

وایروزوم‌های آنفلوانزا در تهیه و گسترش واکسن

۱-۱-مقدمه:

ویروس‌های پوشیده شده با غشا نظیر ویروس آنفلوانزا، حامل اسپایک‌های گلیکو پروتئینی بر روی سطحشان هستند که با رسپتورهای سلولی به ویروس اتصال یافته اند و فیوژن غشای ویروسی با غشاهای سلول‌های هدف در انجام میگیرد. اگر چه نقش اصلی اسپایک‌های پروتئینی در سلول ویروسی آشکار شده است با این وجود شناخت این پروتئین‌ها در زمینه لیپوزومی قابل توجه و مهم می باشد .

به طور وضوح، اسپایک‌های پروتئینی ویروس، یک سیستم مدل مفیدی برای مطالعه بیوشیمی و بیوفیزیک در واکنش‌های غشای ویروس را بیان می‌کند . با این حال اسپایک‌های پروتئینی ویروس، اتصال شونده های خوبی برای هدفمند کردن لیپوزوم‌ها در سلول‌ها به شمار میروند. اولین موفقیت شناخته شدهٔ اسپایک‌های پروتئینی ویروس در زمینهٔ لیپوزوم‌ها توسط المدیا و همکارانش گزارش شده است. با تشکیل لیپوزومها و HA و NA خالص شده از ویروس آنفلوانزا، این محققان توانستند وزیکول های غشایی را با استفاده از اسپایک‌های پروتئینی از سطح وزیکول تولید کنند. زیرا ساختارهای لیپوزومی همانند ویریون‌های اصلی ویروس آنفلوانزا به هم وابسته اند که با میکروسکوپ الکترونی قابل مشاهده اند و وایروزوم‌ها نام دارند. اگر چه ویروس آنفلوانزا، یکی از ویروس هایی است که به علت داشتن گسترش زیاد، به عنوان تولید کنندهای وایروزوم استفاده میشود [بیشتر از این ویروس به خاطر گسترش زیاد در تهیهٔ وایروزوم استفاده میشود].

فصل دوو

تاریخچە و پێشینە پژوهش

تاریخچه

بیماری واگیردار و حاد تنفسی که به نام انفلوانزا شناخته شده، از زمانهای باستان، انسان را در گیر ساخته است. در گذشته بیماری‌های تنفسی بسیاری گزارش شده اند که چندین هفته باقی مانده، سپس به طور ناگهانی ناپدید می‌شدند و علائم آنها به قدری اختصاصی بوده که به عنوان اپیدمی های اصلی ناشی از انفلوانزا شناخته شده اند.

نخستین بار بقراط در سال ۴۱۲ قبل از میلاد یکی از این اپیدمی ها را ثبت نموده است (32) که جمعیت زیادی شامل تمام گروه های سنی را در بر گرفته و در افراد کهنسال یا افراد مبتلا به بیماری‌های مزمن سبب مرگ و میر شده بود. تعداد زیادی از این حوادث در قرون وسطی گزارش شده است اولین گزارش در اروپا در سال ۱۱۷۰ در انگلیس می‌باشد. در سال ۱۵۱۰ در آفریقا یک اپیدمی بروز کرد که به اروپا گسترش یافت. Gippe، Galanterie ، Jally rout ، Petite Pest نام هایی بودند که به این بیماری داده شد. عنوان Influenza اولین بار در سال ۱۳۸۵ توسط ایتالیایی‌ها استفاده شد در واقع Influenza شکل ایتالیایی لغت Influetina به معنی همه گیر یا اپیدمی می‌باشد که طی اپیدمی سال ۱۸۷۲ توسط انگلیسی‌ها پذیرفته و استفاده گردید.

اطلاعات تاریخی سال‌های ۱۸۰۰–۱۵۰۰ میلادی توسط Hrisch Webster جمع‌آوری و توسط Noble بازنگری گردید که برخی از ویژگی های آن به شرح زیر می‌باشد:

اپیدمی ها با قدرت و درجات متفاوت رخ داده، اما در افراد کهنسال سبب مرگ و میر شدند.

اپیدمی‌هایی نظیر سال ۱۷۸۱ از آسیا شروع شد و در سراسر جهان منتشر گردید. اپیدمی های جدید ابتدا در چین ظاهر شده و معمولا در افراد مسن بیشترین میزان مرگ و میر را به همراه داشته است.

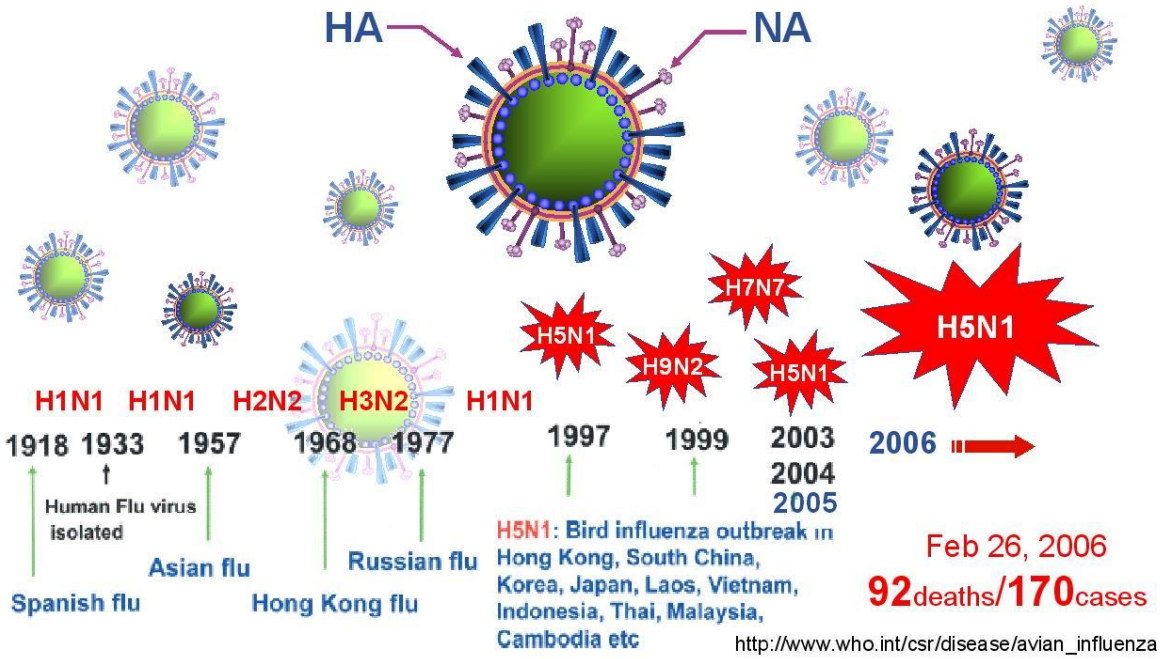
در سال ۱۷۸۹ یک اپیدمی گسترده در فصل پاییز در شهر نیویورک و چند شهر کانادا به وقوع پیوست که اغلب مبتلایان به آن در اثر پنومونی جان باختند. در سالهای ۱۸۳۲ – ۱۸۲۹ و ۱۸۳۸ و ۱۸۳۷ یک اپیدمی در آسیا آغاز گردید و تا اندونزی گسترش یافت و در ادامه در زمستان ۱۸۳۱ – ۱۸۳۰ کشور روسیه تحت تاثیر قرار گرفت و از آنجا اپیدمی به طرف غرب گسترش یافت و در نهایت به ایالات متحده رسید (44).

آنالیز سرواپیدمیولوژیک گذشته نگر بیان گر این است که اپیدمی انفلوانزای انسانی سال ۱۸۹۹ – ۱۸۹۰ توسط ویروسی ایجاد گردید که از نظر آنتی‌ژنی شبیه سویه‌های آسیایی هم دوره یعنی $A(H_2N_2)$ بود. این بیماری از آسیای مرکزی شروع و به سمت شمال در روسیه از سمت شرق در چین و از سمت غرب به سوی اروپا گسترش یافت. در سال ۱۹۰۰-۱۸۹۹ نیز یک همه گیری بزرگ از H_3N_2 به ثبت رسیده است (32).

طی قرون متمادی، بیماری انفلوانزا افراد بی‌شماری را از بین برده است. با وجود این پاندمی سال های ۱۹۱۹ – ۱۹۱۸ یکی از سخت‌ترین و شدیدترین همه گیریهای انسانی انفلوانزا بوده است. این بیماری که به انفلوانزای اسپانیایی معروف

است فاجعه آمیزترین پاندمی در طول تاریخ به شمار می‌رود به طوری که میزان مرگ و میر آن از تلفات جنگ بیشتر بود و تخمین زده می‌شود که حداقل ۵۰ میلیون نفر جان خود را از دست داده باشند. شدت این بیماری به حدی زیاد بود که باعث تسریع تحقیقات درباره عامل مسبب این بیماری گردید (45).

در اوایل دهه ۱۹۲۰ Richard E. Shope نشان داد که انفلوانزای خوکی توسط ترشحات موکوزی فیلتر شده منتقل می‌شود و لذا عامل مسبب بیماری را ویروس دانست. در سال ۱۹۳۳ در انگلستان ویروس انفلوانزای تیپ $A(H_1N_1)$ توسط Patrick Laidlaw Sir ChristoPHer Andrewes. Sir،Wilson Smith از انسان جدا شد. کشت ویروس در تخم مرغ جنین دار در سال ۱۹۴۰ توسط Burnet منجر به پیشرفت سریع در شناسایی این ویروس گردید. انفلوانزای C نیز نخستین بار در سال ۱۹۴۷ توسط Taylor شرح داده شد (32).



تصویر ۱-۲- پاندمی های انفلوانزا

منشا پاندمی سال ۱۹۵۷ که توسط ویروس $A(H_2\ N_2)$ ایجاد گردید، احتمالاً در روسیه بوده که بعداً در سراسر اقیانوس آرام گسترش یافت. این اپیدمی ۳۵- ۱۰ درصد جمعیت جهان را مبتلا کرد ولی در مجموع میزان مرگ و میر آن بسیار کمتر از اپیدمی ۱۹۱۸ بود.