

الحمد لله  
البرحمين



دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری تخصصی میکروبیولوژی

عنوان:

کلونینگ و بیان ژن NP ویروس آنفلوآنزای پرندگان

تحت تیپ H9N2 در اشرشیاکلی

نگارش:

دکتر امین جایدری

اساتید راهنما:

دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری

دکتر مسعود قربانپورنجف آبادی

خرداد ۱۳۹۰

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

پایان نامه دکتری تخصصی میکروبیولوژی

عنوان

کلونینگ و بیان ژن NP ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در اشرشیاکلی

نگارش

دکتر امین جایدری

دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری.....استاد راهنمای اول

(استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر مسعود قربانپور نجف آبادی.....استاد راهنمای دوم

(استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر منصور میاحی.....استاد مشاور

(استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر مهدی پورمهدی بروجنی.....استاد مشاور

(استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر منوچهر مکوندی.....داور

(استاد دانشکده پزشکی دانشگاه جندی شاپور اهواز)

دکتر سید علی پوربخش.....داور

(دانشیار محترم موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی)

دکتر رمضانعلی جعفری.....داور

(دانشیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

دکتر عباس جلو دار.....داور

(استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز)

خرداد ۱۳۹۰

بارالها به هر درجه ای که مراند مردم رفعت می بخشند به همان درجه مراند خودم پست و  
ذلیل گردان و به هر عزتی که در ظاهر به من عطا می کنی به همان اندازه ذلت و حقارت به  
باطن داتم عنایت فرما.

صحیفه سجاده

ای کسب دانش بهتر از مال است زیرا علم نگهبان تو است و مال را تو باید نگهبان  
باشی، مال با بخشش کاستی پذیرد اما علم با بخشش فزونی گیرد و مقام و شخصیتی که با مال به  
دست آمده بیابا بودی مال، از بین می رود.

نجم البلاغه، حکمت ۱۴۷

تقدیم بہ آنانکہ بہ چون شمعی روشنی بخش زندگیم بودہ اند

تقدیم بہ

روح پاک و مہر پدر مہربانم

کہ عارفانہ دعوت حق را بیک گفت و بہ حقیقت پیوست

روحش شاد و یادش کرامی باد

تقدیم بہ

مادرم

او کہ با صبر و سگیانی بی مانندش بہ من روش زندگی و درس توکل ایثار آموخت

تقدیم به همسر عزیزم:

به پاس تعبیر عظیم و انسانی اش از کلمه می‌ایثار و از خودگذشتگی

یاور همیشگی و شریک تمام لحظات سخت زندگی ام

او که صبورانه در کنارم ماند و برای به اوج رسیدن من بال پروازم شد.

همسیری هم‌تایم دوست دارم و از خداوند برای تو بهترین‌ها را خواستارم.

تقدیم بہ مادر و پدر، ہمسر

کہ ہمارے پشیمان من بودند و با دلگرمی ہائشان امید زندگی را در دلم سگوفامی کنند

تقدیم بہ یکانہ برادر

شہریار و ہمسر کرامی اش و نور دیدگان شان

نیایش و امیر علی

تقدیم بہ خواہرم

پری و ہمسر کرامی اش و نور دیدگان شان

علیرضا و نیلوفر

پروردگارا

هرچه دارم از لطف و مهربانی تو ست و خوب می دانم که هیچ گاه نمی توانم سپاسگذار این همه خوبی تو باشم، اما تو با لطف بی پایان خود سپاس مرا بپذیر، ای مهربان دوست داشتنی.

الکون که به لطف خداوند مهربان این پایان نامه به پایان رسیده بر خود لازم می دانم از همه عزیزانی که مراد انجام آن یاری نموده اند، تقدیر و تشکر نمایم.

باسپاس فراوان از:

✓ جناب آقای دکتر صیفی و جناب آقای دکتر قربانپور، که با صبر و حوصله فراوان، دقت نظر خاص و دانش پر بار خود راهنمایی پایان

نامه اینجانب را پذیرا شدند و همواره بار راهنمایی های ارزنده خویش حقیر را مهربون لطف و محبت خود قرار داده اند و در تمامی مراحل

انجام این تحقیق از هیچ تلاشی فروگذار نبوده اند.

✓ جناب آقای دکتر میامی و جناب آقای دکتر پورمحمدی اساتید گرانقدرم که همواره با ممانعت پانگلوئی سؤالاتم بوده اند و مسئولیت

مشاوره پایان نامه بنده را پذیرفتند.



✓ جناب آقای دکتر مکوندی، جناب آقای دکتر پورنخس، جناب آقای دکتر حسینی و جناب آقای دکتر جلودار که با بزرگواری

تام، نقل داورى این پایان نامه را پذیرفتند.

✓ جناب آقای دکتر راضی جلالی که با سه صدر نظارت پایان نامه را بر عهده گرفتند.

✓ جناب آقای دکتر محمود جمشیدیان، که افتخار نگارگری در محضر ایشان داشتم. با آرزوی سلامتی برای ایشان و خانواده محترم

✓ جناب آقای دکتر موتی، ریاست محترم دانشگاه شهید چمران اهواز

✓ جناب آقای دکتر پیغان، ریاست محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه شهید چمران اهواز

✓ جناب آقای دکتر آویزه، معاونت محترم آموزشی دانشگاه دامپزشکی اهواز

✓ جناب آقای دکتر فاطمی، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه دامپزشکی اهواز

✓ جناب آقای دکتر راضی جلالی، مدیر محترم گروه پاتوبیولوژی

✓ جناب آقای دکتر معتمدی، مدیر محترم گروه زیست شناسی دانشگاه علوم

✓ جناب آقای دکتر علیشاهی، مسئول محترم کتابخانه دانشگاه دامپزشکی

✓ جناب آقای دکتر عرفانی مجد، دبیر محترم مجله دامنپوشی ایران

✓ آقایان دکتر محمدی، دکتر البرزی، دکتر حمیدی نجات، دکتر زارعی، دکتر شیریاری، دکتر نجف زاده، دکتر تاننده، دکتر اسماعیل

زاده، دکتر معربی، دکتر مصلی نژاد، دکتر نداف، دکتر غدیری، دکتر خاکسار، دکتر فضل آرا، دکتر گلتنی، دکتر براتی، دکتر مصباح،

دکتر محمدیان و خانم دکتر رضایی

✓ و با آرزوی غفران الهی برای زنده یاد دکتر احمد علی پاپهن، استاد فقید، بخش فیزیولوژی دانشکده دامنپوشی دانشگاه اهواز که از

راهبانی های بی دریغ او بسیار بهره گرفتیم.

باشکد و قدردانی از:

کلیه کارکنان صدیق و زحمتکش دانشکده دامپزشکی:

سرکار خانم نظرپور، سرکار خانم داغری و جناب آقای غلیم پور کارشناسان محترم بخش میکروب شناسی و ویروس شناسی، خانم ارزانی کارشناس محترم آموزش دانشکده، سرکار خانم تسلیمی و کردونی کارکنان محترم بخش پشه‌شناسی دانشکده، سرکار خانم نجفی، ثابتی، فرزام و شهابی کارکنان محترم کتابخانه دانشکده، سرکار خانم خواجه کارشناس محترم بخش آنکس شناسی، سرکار خانم جلودار کارشناس محترم بخش فیزیولوژی، سرکار خانم اصفهانی کارشناس محترم بخش صنایع غذایی، سرکار خانم ماندنی زاده کارشناس محترم گروه پاتوبیولوژی، جناب آقای ایرانشاهی کارشناس محترم بخش بافت شناسی، جناب آقای سهیلی کارشناس محترم بخش بیوشیمی، سرکار خانم کیانی کارشناس محترم بخش فارماکولوژی، سرکار خانم عباسی کارشناس محترم مجله دامپزشکی ایران، سرکار خانم صالحی مسئول دفتر حوزه ریاست، سرکار خانم اکبریان مسئول سایت کامپیوتر دانشکده، جناب آقای باردل مسئول زیراکس دانشکده و آقایان غلیم پور، اکبری و مشهداوی کارکنان زحمتکش دانشکده.

باساس فراوان از:

محبت‌های صمیمانه به‌کار بسیار کرامی سرکار خانم دکتر بختیاری. سلامتی، موفقیت، و توفیق روز افزون ایشان و خانواده محترم شان را از درگاه خداوند متعال خواستارم.

باشکد از سایر دوستان و عزیزان:

سرکار خانم دکتر طلا زاده و آقایان دکتر محمودی، دکتر رشو، دکتر رجب زاده، و آقای افضل زاده

و همه‌ی کسانی که در طول دوران تحصیل و انجام این پایان‌نامه از به‌کار و مساعدتشان بهره‌مند گردیدم.

## چکیده پایان نامه

نام خانوادگی: جایدری	نام: امین
عنوان پایان نامه: کلونینگ و بیان ژن NP ویروس آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در اشرشیاکلی	
استاد راهنما: دکتر مسعود رضا صیفی آباد شاپوری - دکتر مسعود قربانپور نجف آبادی	
درجه تحصیلی: دکترای تخصصی میکروبیولوژی	رشته: دامپزشکی
دانشگاه: شهید چمران اهواز	
دانشکده: دامپزشکی	
تاریخ فارغ التحصیلی: ۱۳۹۰/۳/۱۷	تعداد صفحه: ۱۶۶
کلیدواژه: ویروس آنفلوآنزای پرندگان، نوکلئوپروتئین، H9N2، NP- ELISA	
خلاصه فارسی:	
<p>آنفلوآنزای پرندگان یک بیماری عفونی خطرناک و با اهمیت جهانی است که خسارات مالی قابل توجهی به صنعت طیور تحمیل می کند. ویروس آنفلوآنزای پرندگان از جنس آنفلوآنزایروس A و از خانواده ارتومیکسوویریده می باشد. یک برنامه مراقبتی مناسب مانند جستجوی سرولوژیکی آنتی بادی های تولید شده بر ضد ویروس آنفلوآنزای پرندگان، اهمیت زیادی در پیشگیری و کنترل آنفلوآنزای پرندگان دارد. تشخیص سرمی بر اساس بررسی آنتی بادی تولید شده بر ضد نوکلئوپروتئین (NP) که در میان همه ویروس های A آنفلوآنزا حفاظت شده است، می تواند برای نشان دادن سطح ایمنی ضد همه تحت تیپ های ویروس A آنفلوآنزا استفاده گردد. هدف از این مطالعه تولید پروتئین نوترکیب NP و طراحی الیزا با آن بود. بدین منظور ناحیه کدکننده ژن نوکلئوپروتئین جدایه ای از ویروس آنفلوآنزای پرندگان A/chicken/Iran/AH-1/06(H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>) با آزمایش RT-PCR تکثیر و به درون وکتور بیانی - پروکاریوتی (pMal-C<sub>2</sub>X) کلون شده و به داخل باکتری اشرشیا کلسی</p>	

سویه BL21(DE<sub>3</sub>) ترانسفورمه گردید. پروتئین نوترکیب MBP-NP بیان شده در *اشرشیا کلی* با کمک ستون کروماتوگرافی رزین-آمیلوز خالص شد و به عنوان یک آنتی ژن تشخیصی به منظور طراحی یک الیزای غیرمستقیم اختصاصی تیپ براساس نوکلئوپروتئین، جهت بررسی آنتی بادی های تولید شده ویروس آنفلوانزای پرندگان در سرم ماکیان ، مورد استفاده قرار گرفت. NP-ELISA طراحی شده با کیت الیزای تجاری ویروس آنفلوانزای پرندگان مقایسه گردید. توافق عالی (۹۳٪) بین NP-ELISA و کیت الیزای تجاری مشاهده گردید ( $k=0.95$ ). نتایج نشان داد که NP-ELISA نسبت به کیت الیزای تجاری در تشخیص آنتی بادی در ماکیان آلوده شده با ویروس آنفلوانزای پرندگان، حساسیت بیشتری داشت اما این اختلاف معنی دار نبود. این یافته ها حاکی از آن است که الیزای غیرمستقیم طراحی شده براساس پروتئین نوترکیب NP، آزمایشی حساس و اختصاصی است و می تواند در امر تشخیص و بررسی های سرواپیدمیولوژیکی به منظور پیشگیری و کنترل ویروس آنفلوانزای پرندگان در دراز مدت استفاده گردد.

# فهرست مطالب

عنوان

صفحه

## فصل اول: مقدمه و هدف

مقدمه و هدف ..... ۲

## فصل دوم: مروری بر منابع موجود

الف- تاریخچه بیماری آنفلوآنزای طیور..... ۷

الف-۱- تحت تیپ  $H_9N_2$ ..... ۸

الف-۲- سبب شناسی..... ۱۱

الف-۲-۱- طبقه بندی..... ۱۱

الف-۲-۲- ساختار ویریون..... ۱۲

الف-۲-۲-۱- هماگلو تینین..... ۱۴

الف-۲-۲-۲- نور آمینیداز..... ۱۵

الف-۲-۲-۳- نوکلئوپروتئین..... ۱۷

الف-۲-۲-۳-۱- فعالیت اتصال به RNA..... ۱۹

الف-۲-۲-۳-۲- واکنش NP با کمپلکس پلیمرازی ویروس.....	۲۱
الف-۲-۲-۳-۳- واکنش NP با M1.....	۲۱
الف-۲-۲-۳-۴- نقش NP در چرخه تکثیر ویروس.....	۲۱
الف-۲-۲-۳-۵- ساختمان NP.....	۳۰
الف-۲-۲-۴- کمپلکس RNA پلیمراز.....	۳۵
الف-۲-۲-۴-۱- پروتئین PB1.....	۳۵
الف-۲-۲-۴-۲- پروتئین PB2.....	۳۶
الف-۲-۲-۴-۳- پروتئین PA.....	۳۶
الف-۲-۲-۵- پروتئین ماتریکس.....	۳۷
الف-۲-۲-۶- پروتئین غیر ساختمانی.....	۳۸
الف-۳- تشخیص آزمایشگاهی ویروس آنفلوانزا.....	۳۹
الف-۳-۱- روش جداسازی ویروس.....	۳۹
الف-۳-۲- روش‌های تشخیص آنتی‌ژن‌های ویروس.....	۴۳
الف-۳-۲-۱- روش‌های مشاهده‌ای.....	۴۳

الف-۳-۲-۲- Antigen capture-Enzyme Immunoassay (AC-EIA) ..... ۴۴

الف-۳-۳- روش‌های سرولوژی ..... ۴۵

الف-۳-۴- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ..... ۴۸

### فصل سوم: مواد و روش کار

الف- مواد و وسایل مورد نیاز ..... ۵۳

الف-۱- مواد ..... ۵۳

الف-۲- وسایل مورد نیاز ..... ۵۷

ب- طرز تهیه بافرها و محلول‌های مورد استفاده ..... ۵۸

ب-۱- طرز تهیه آب مقطر RNase free ..... ۵۸

ب-۲- تهیه بافر بارگذاری برای ژل آگارز ..... ۵۹

ب-۳- طرز تهیه بافر TAE ..... ۵۹

ب-۴- تهیه محلول استوک اتیدیوم بروماید ..... ۵۹

ب-۵- تهیه محلول TSS 2X برای ترانسفرماسیون ..... ۶۰

ب-۶- تهیه محلول‌های لازم برای انجام Miniprep (روش لیزآلکالاین) ..... ۶۰



- ب-۷- طرز تهیه محیط‌های LB ..... ۶۱
- ب-۸- طرز تهیه محلول استوک ۰/۱ مولار IPTG ..... ۶۲
- ب-۹- طرز تهیه محلول استوک XGal ..... ۶۲
- ب-۱۰- تهیه محلول‌های لازم برای SDS-PAGE ..... ۶۲
- ب-۱۰-۱- طرز تهیه محلول ۳۰ درصد اکریل آمید ..... ۶۲
- ب-۱۰-۲- طرز تهیه بافر حرکت دهنده (1x) ..... ۶۳
- ب-۱۰-۳- طرز تهیه SDS – PAGE Sample buffer 2x ..... ۶۳
- ب-۱۰-۴- طرز تهیه محلول رنگ آمیزی کوماسی بلو ..... ۶۳
- ب-۱۰-۵- طرز تهیه محلول رنگ بر ..... ۶۳
- ب-۱۰-۶- مواد و مقادیر لازم برای ساخت ژل‌های جداکننده و متراکم‌کننده ..... ۶۴
- ب-۱۰-۷- طرز تهیه بافر انتقال برای وسترن بلاتینگ ..... ۶۵
- ب-۱۱- طرز تهیه استوک گلوکز ۱۰ درصد ..... ۶۵
- ب-۱۲- طرز تهیه PBS-T ..... ۶۶
- ب-۱۳- طرز تهیه PBS (1x) ..... ۶۶
- ب-۱۴- طرز تهیه PBS-T – skim milk (5%) ..... ۶۶

- 
- ب-۱۵- طرز تهیه بافر ستون ..... ۶۶
- ب-۱۶- طرز تهیه **Coating Buffer** ..... ۶۶
- ب-۱۷- طرز تهیه بافر استات سدیم ..... ۶۷
- ب-۱۸- تهیه استوک آب اکسیژنه ۳٪ ..... ۶۷
- ب-۱۹- تهیه استوک **TMB** (۱ درصد) ..... ۶۷
- ب-۲۰- تهیه کروموزن - سوبسترا برای الیزا ..... ۶۷
- ج- روش کار ..... ۶۸
- ج-۱- مراحل تحقیق ..... ۶۸
- ج-۱-۱- سویه ویروسی ..... ۶۹
- ج-۱-۲- طراحی پرایمر ..... ۶۹
- ج-۱-۳- تکثیر ویروس ..... ۶۹
- ج-۱-۴- استخراج **RNA** ..... ۷۰
- ج-۱-۵- تهیه **cdNA** ..... ۷۱
- ج-۱-۶- **PCR** ..... ۷۲
- ج-۱-۶-۱- برنامه حرارتی **PCR** ..... ۷۳

ج-۱-۶-۲- بررسی محصول RT-PCR با الکتروفورز در ژل آگارز.....	۷۳
ج-۱-۶-۳- خالص سازی محصول RT-PCR.....	۷۴
ج-۱-۷- تکثیر و خالص سازی وکتور.....	۷۴
ج-۱-۸- استخراج پلاسمید.....	۷۷
ج-۱-۸-۱- روش Miniprep.....	۷۷
ج-۱-۸-۲- استخراج پلاسمید با استفاده از کیت.....	۷۸
ج-۱-۹- مراحل کلونینگ.....	۷۸
ج-۱-۹-۱- هضم آنزیمی.....	۷۸
ج-۱-۹-۲- اتصال.....	۷۹
ج-۱-۹-۳- ترانسفورماسیون.....	۸۰
ج-۱-۹-۴- غربالگری کلونی های حاصل از ترانسفورماسیون.....	۸۰
ج-۱-۹-۴-۱- روش غربالگری سفید - آبی.....	۸۰
ج-۱-۹-۴-۲- انجام PCR بر روی باکتری ها.....	۸۱
ج-۱-۹-۴-۳- هضم آنزیمی.....	۸۲
ج-۱-۱۰- تعیین توالی ژن کلون شده.....	۸۲

- 
- ج-۱-۱۰-۱- آنالیز فیلوژنتیک ..... ۸۲
- ج-۱-۱۱-۱- بررسی بیان پروتئین NP ..... ۸۳
- ج-۱-۱۱-۱- القاء بیان پروتئین با IPTG ..... ۸۳
- ج-۱-۱۱-۲- SDS-PAGE ..... ۸۴
- ج-۱-۱۱-۲-۱- آماده سازی قالب ..... ۸۴
- ج-۱-۱۱-۲-۲- تهیه ژل پلی اکریل آمید ..... ۸۴
- ج-۱-۱۱-۲-۳- آماده سازی نمونه ها و مارکر وزن مولکولی ..... ۸۵
- ج-۱-۱۱-۲-۴- آماده سازی تانک الکتروفورز و بارگذاری نمونه ها ..... ۸۶
- ج-۱-۱۱-۲-۵- رنگ آمیزی پروتئین های الکتروفورز شده با آبی کوماسی ..... ۸۷
- ج-۱-۱۱-۳- وسترن بلائینگ ..... ۸۸
- ج-۱-۱۱-۴- خالص سازی پروتئین ..... ۸۹
- ج-۱-۱۱-۵- آزمایش الیزا با کیت تجاری ..... ۹۱
- ج-۱-۱۱-۶- طراحی آزمایش الیزا با استفاده از NP نو ترکیب ..... ۹۱
- ج-۱-۱۱-۶-۱- به دست آوردن رقت های مناسب در آزمایش الیزا ..... ۹۲
- ج-۱-۱۱-۶-۲- روش آزمایش الیزای استاندارد شده برای نمونه ها ..... ۹۳