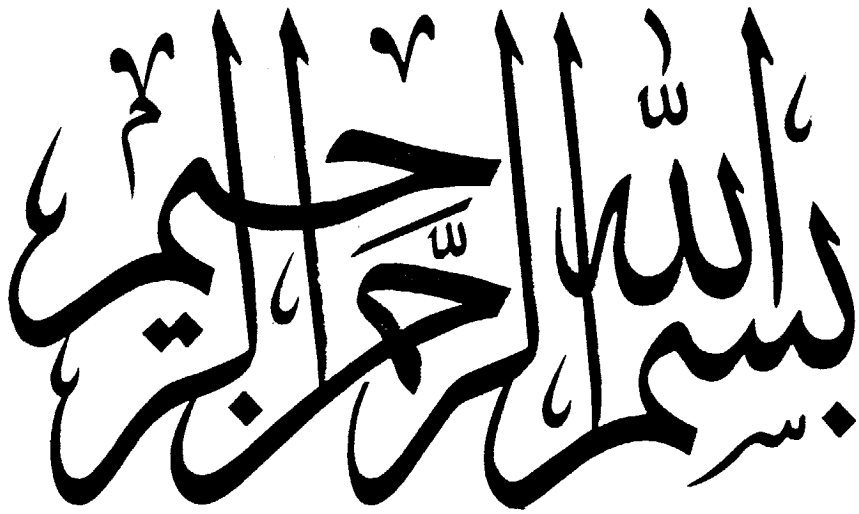

٣١١٨٧

۱۳۷۹ /۴/ ۱۰

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تصویب مدارک

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه

برای دریافت دانشنامه کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی

عنوان

اثر بافرهای گوناگون در روش PCR تشخیصی HBV

نگارش

مریم جزایری

7309

استاد راهنما

جناب آقای دکتر محمد تقی خانی

استاد مشاور

جناب آقای دکتر علی طالبیان

بهار ۱۳۷۹

۳۱۱۸۷

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان‌نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله‌پایان‌نامه‌کارشناسی‌ارشدخانم/آقای **مریم جزایری** رشته: **بیوشیمی بالینی**
تحت‌عنوان: **اثر بافرهای گوناگون در روش PCR تشخیصی HBV**

تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخه نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تائید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

آقای دکتر محمد تقی‌خانی (استاد راهنما) ۷۹/۱/۲۰

آقای دکتر علی‌طالبیان (استاد مشاور)

خانم دکتر فاطمه کرمی تهرانی (نماینده تحصیلات تکمیلی)

آقای دکتر صمدی (استاد ناظر)

آقای دکتر محمدجواد رسایی (استاد ناظر)

مرکز اطلاعات ... جمهوری اسلامی ایران

بسمه تعالی

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

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

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/~~رسالهٔ دکتری~~ نگارنده در رشتهٔ بیوشیمی است که در سال ۱۳۷۹ در دانشکدهٔ علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی ~~سرکار~~خانم/جناب آقای دکتر تقی خانی ، مشاورهٔ ~~سرکار~~خانم/جناب آقای دکتر طالبیان و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر ــ از آن دفاع شده است.»

مادّهٔ 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 اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ 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 مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب مریم جزایری دانشجوی رشته بیوشیمی‌بالینی مقطع کارشناسی‌ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی: مریم جزایری

تاریخ و امضا: ۷۹/۲/۱۹

تقدیم به

پژوهندگان علم و دانش

سپاسنامه

با اغتنام فرصت و مناسبت موقعیت :

○ از استاد گرامی و فرهیخته جناب آقای دکتر تفی‌خانی که با راهنمایی‌های ارزشمند و حکیمانه روشنگر مسیر این پژوهش بوده‌اند سپاسگزاری می‌نمایم.

○ شایسته است از استاد ارجمند جناب آقای دکتر طالبیان که با خلوص نیت از هرگونه مشاورت و معاضدت دریغ نفرموده‌اند، قدردانی نمایم.

○ بسیاربجاست از جناب آقای دکتر سمیعی که با حسن‌طویت در تمامی مراحل انجام این تحقیق و تفحص مساعدت فرموده‌اند، تشکر نمایم.

در پایان لازم می‌دانم از مدیر محترم گروه بیوشیمی سرکار خانم دکتر کرمی و تمامی اساتید گرامی این گروه و همچنین از کارکنان محترم اداره‌های آموزش و پژوهش دانشکدهٔ پزشکی دانشگاه تربیت مدرس قدردانی نمایم.

در ضمن از مدیریت محترم آزمایشگاه تشخیص طبی سرکار خانم دکتر امینی و کلیه پرسنل محترم سازمان انتقال خون ایران بالاخص خانم‌ها عطایی ، رنجبر ، فخاریان ، آقای غفاری و نیز از کادر بخش خدمات اداری و پژوهشی آن سازمان ، به ویژه خانم‌ها لاری، فردوس ، تنهایی ، قبادی و پرسنل محترم کتابخانهٔ سازمان خانم نقیبی و شاه‌بابا تشکر می‌کنم.

همچنین از سرکار خانم دکتر سهیلی قدردانی می‌شود.

چکیده :

تعداد زیادی از متغیرها می‌توانند به طور بارزی نتیجه حاصل از DNA PCR را تغییر دهند. نتیجه مطلوب، ناشی از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی است که به صورت یک باند منفرد در ژل رنگ‌آمیزی شده، مشخص می‌شود. عواملی که می‌توانند نتیجه تکثیر DNA هدف (آمپلیفیکاسیون) یک واکنش PCR را تحت تأثیر قرار دهند، شامل عوامل چرخه‌ای، همچنین غلظت‌های املاح، Mg^{2+} ،dNTP, H^{+} ، پرایمر، الگو و تقویت‌کننده‌ها می‌باشند. هر واکنش PCR شرایط مطلوب موردنظر خود را دارد. با این حال، معمولاً هریک از مقادیر به صورت تجربی تعیین می‌شوند. بافر PCR یکی از ترکیبات مهم در واکنش PCR است که از چندین قسمت تشکیل شده و عبارتند از : تریس ، تقویت‌کننده ، یون Mg^{2+} و دیگرکاتیونها. هدف از این مطالعه ، بررسی نقش کاتیون در فرایند PCR می‌باشد. به همین دلیل، HBV DNA به عنوان یک مدل برای ارزیابی و سنجش واکنش PCR انتخاب گردید. واکنش بر طبق دستورالعمل رایج PCR، بوسیله روش Hot Start انجام شد. کاتیون در فرم نمک شامل KCl، NaCl، $(NH_4)_2SO_4$ مورد استفاده قرارگرفته که به عنوان جزء ترکیبی بافر PCR ۱۰X بوده و از این بافرها به همراه ترکیبات دیگری نظیر $MgCl_2$ و گلیسرول محلول‌های متعددی بنام Supermix ساخته شدند. از میان این مطالعات، نخست یک نتیجه مقدماتی واکنش PCR با غلظت ثابتی از کاتیون در بافر PCR ۱۰X بدست آمد. سپس Supermixهای فوق الذکر با Mastermix ای که بوسیله چندین پرایمر مختلف HBV ساخته شده بود، مورد آزمایش قرارگرفتند. همانطورکه نتایج نشان می‌دهد هیچگونه باند غیر اختصاصی یا پرایمر دایمر در هیچیک از واکنشها رؤیت نشد. از سوی دیگر، هیچگونه همبستگی به پرایمر نیز مشاهده نگردید. ترکیب ۳ بافر مختلف (III, II, I) باکاتیونها و غلظتهای متفاوت نشان می‌دهد که : بافر I در ۴۰۰mM KCl و بافر II در ۴۰۰mM NaCl یک سیگنال مشابه با پانل DNA در رقت ۱۰۲۴ : ۱ نشان داده‌اند. در مقایسه ، ۱۰ برابر افزایش در پاسخ PCR نسبت به پانل DNA همراه با بافر [III $(NH_4)_2SO_4$ ۱۰۰mM، ۱۰۰mM KCl] مشاهده شده به نظر می‌رسد، یون آمونیوم سیگنال (باند مثبت) تکثیر PCR را نسبت به دو یون دیگر افزایش داده است و این یون اثر یون پتاسیم را تقویت می‌نماید.

نهایتاً، در این کار محرز شد که دیگر ترکیبات بافر PCR ۱۰X (مانند یون) نقش خاصی در نتیجه واکنش PCR دارند. بنابراین، مشابه دیگر پارامترهای دخیل در PCR مانند یون Mg^{2+} و تقویت‌کننده‌هایی نظیر گلیسرول، Triton X-100 تأثیر یون شرکت کننده در بافر نیز بایستی مد نظر قرارگیرد.

کلمات کلیدی : بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ، بهینه سازی.

کاتیون / cation

Polymerase chain reaction

اسید دی‌اکسی ریبونوکلئیک

Deoxyribonucleic Acid

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل اول : مقدمه (PCR) ۱

۱-۱- تاریخچهٔ PCR ۲

۱-۲- معرفی PCR ۴

۱-۳- اصول PCR ۴

۱-۴- بررسی PCR ۵

۱-۴-۱- PCR با DNA پلی‌مراز I قطعه Klenow ۵

۱-۴-۲- معرفی Taq Polymerase مقاوم به حرارت ۶

۱-۴-۳- The Long - Range PCR ۷

۱-۵- ترکیبات PCR و شرایط واکنش نمونه ۸

۱-۵-۱- طراحی پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی ۸

۱-۵-۲- انتخاب توالی هدف ۱۰

۱-۵-۳- دزاکسی نوکلئوتید تری‌فسفاتها ۱۰

۱-۵-۴- غلظت $MgCl_2$ ۱۱

۱-۵-۵- DNA پلی‌مراز ۱۱

۱-۵-۶- بافر واکنش ۱۱

۱-۵-۷- مواد اضافی واکنش ۱۲

۱-۵-۸- مهارکننده‌های PCR ۱۳

۱-۵-۹- آنالیز PCR توالی های هدف DNA ۱۵

۱-۵-۱۰- آلودگی (Contamination) ۱۶

۱-۶- بهینه‌سازی PCR ۱۸

۱-۶-۱- دمای Annealing ۱۸

۱-۶-۲- بافر واکنش ۱۹

۱-۶-۳- غلظت دزاکسی نوکلئوتیدها ۲۰

۱-۶-۴- DNA پلی‌مراز مقاوم به حرارت ۲۰

۱-۶-۵- پایدارکننده‌های آنزیم ۲۱

عنوان | صفحه

۱-۶-۶- غلظت پرایمرها ۲۱
۱-۶-۷- نسبت پریمر به الگو ۲۲
۱-۶-۸- پروفایل چرخه برای تکثیر ۲۲

فصل دوم : مقدمه (HBV)..... ۲۴
۲-۱- تاریخچه ویروس هپاتیت B..... ۲۵
۲-۲- ساختمان ویروس هپاتیت B..... ۲۶
۲-۲-۱- انواع ذرات..... ۲۶
۲-۲-۲- ژنوم ویروسی..... ۲۷

فصل سوم : ابزار، مواد و روشها ۳۱
۳-۱- پرایمر (Primer) ۳۲
۳-۲- مواد..... ۳۲
۳-۳- دستگاهها..... ۳۳
۳-۴- طرز تهیه مواد..... ۳۴
۳-۴-۱- طرز تهیه Mastermix..... ۳۴
۳-۴-۲- طرز تهیه PCR ۱۰X buffers ۳۵
۳-۴-۳- طرز تهیه Supermix..... ۳۹
۳-۴-۴- طرز تهیه پانل HBV-DNA ۳۹
۳-۵- روش کار..... ۴۰
۳-۵-۱- روش استخراج DNA ۴۰
۳-۵-۲- واکنش PCR ۴۱
۳-۵-۳- روش الکتروفورز ۴۳

فصل چهارم : نتایج ۴۵
۴-۱- بررسی اولیهٔ بافرهای III و II و I..... ۴۶

عنوان | صفحه

۴-۲-اثر پرایمرهای ۱۳و۱۱ MD، ۲و۱ Boh بر بافرهای I و II و III ۴۹

۴-۳-تهیه HBV-DNA Panel ۵۴

۴-۴-نتایج HBV-DNA PCR حاصل از Supermix بافر I ۵۹

۴-۵-نتایج HBV-DNA PCR حاصل از Supermix بافر II ۶۵

۴-۶-نتایج HBV-DNA PCR حاصل از Supermix بافر III ۷۱

۴-۷-مقایسه بافرهای III و II و I ۷۷

فصل پنجم: بحث ۸۱

منابع ۸۸

Abbreviations:

DRS	Direct Repeat Short
HBcAg	Hepatitis B core Antigen
HBeAg	Hepatitis B e Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction
Taq	Thermus aquaticus
T_d	Temperature of dissociation
T_m	Temperature of melting
UV	UlteraViolet

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۴-۱- نتایج HBV-DNA PCR پانل DNA ۵۵
جدول ۴-۲- نتایج HBV-DNA PCR حاصل از Supermix بافرI ۶۰
جدول ۴-۳- نتایج HBV-DNA PCR حاصل از Supermix بافر II ۶۶
جدول ۴-۴- نتایج HBV-DNA PCR حاصل از Supermix بافر III ۷۲

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۴-۱- مقایسه روشهای Roche و ابن‌سینا در HBV-DNA PCR..... ۵۸
نمودار ۴-۲- بررسی نتایج HBV-DNA PCR مربوط به Supermix بافر I..... ۶۴
نمودار ۴-۳- بررسی نتایج HBV-DNA PCR مربوط به Supermix بافر II ۷۰
نمودار ۴-۴- بررسی نتایج HBV-DNA PCR مربوط به Supermix بافر III..... ۷۶
نمودار ۴-۵- مقایسه Supermix های حاصل از بافرهای I و II و III در HBV-DNA PCR ۷۹
نمودار ۴-۶- مقایسه انواع Supermix های حاصل از بافرهای I و II و III ۸۰

فهرست تصاویر

عنوان **صفحه**

تصویر ۴-۱- الکتروفورز HBV-DNA PCR مربوط به بافر I ۴۷

تصویر ۴-۲- الکتروفورز HBV-DNA PCR مربوط به بافر II ۴۷

تصویر ۴-۳- الکتروفورز HBV-DNA PCR مربوط به بافر III ۴۷

تصویر ۴-۴- الکتروفورز HBV-DNA PCR مربوط به بافر ابن‌سینا ۴۸

تصویر ۴-۵- الکتروفورز HBV-DNA PCR مربوط به بافر بهرینگر ۴۸

تصویر ۴-۶- الکتروفورز HBV-DNA PCR با پرایمر MD۱۱،۱۳ و بافر ابن سینا ۵۰

تصویر ۴-۷- الکتروفورز HBV-DNA PCR با پرایمر ۱۳و۱۱ MD و بافر I ۵۰

تصویر ۴-۸- الکتروفورز HBV-DNA PCR با پرایمر ۱۳و۱۱ MD و بافر II ۵۱

تصویر ۴-۹- الکتروفورز HBV-DNA PCR با پرایمر ۱۳و۱۱ MD و بافر III ۵۱

تصویر ۴-۱۰- الکتروفورز HBV-DNA PCR با پرایمر ۲و۱ Boh و بافرابن‌سینا ۵۲

تصویر ۴-۱۱- الکتروفورز HBV-DNA PCR با پرایمر ۲و۱ Boh و بافر I ۵۲

تصویر ۴-۱۲- الکتروفورز HBV-DNA PCR با پرایمر ۲و۱ Boh و بافر II ۵۳

تصویر ۴-۱۳- الکتروفورز HBV-DNA PCR با پرایمر ۲و۱ Boh و بافر III ۵۳

تصویر ۴-۱۴- الکتروفورز PCR پانل HBV-DNA باکیت ابن سینا ۵۶

تصویر ۴-۱۵- الکتروفورز PCR پانل HBV-DNA باکیت ابن‌سینا و پرایمر ۲و۱ Boh ۵۶

تصویر ۴-۱۶- الکتروفورز PCR پانل HBV-DNA باکیت ابن‌سینا و پرایمر ۱۳و۱۱ MD ۵۷

تصویر ۴-۱۷- الکتروفورز PCR پانل HBV-DNA باکیت Roche ۵۷

تصویر ۴-۱۸- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر A۰ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA ۶۱

تصویر ۴-۱۹- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر A۱ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA ۶۱

تصویر ۴-۲۰- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر A۲ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA ۶۲

تصویر ۴-۲۱- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر A۳ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA ۶۲

تصویر ۴-۲۲- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر A۴ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA ۶۳

تصویر ۴-۲۳- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر A۵ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA ۶۳

تصویر ۴-۲۴- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر B۰ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA ۶۷

تصویر ۴-۲۵- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر B۱ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA ۶۷

عنوان	صفحه

تصویر ۴-۲۶- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر B۲ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA . . ۶۸

تصویر ۴-۲۷- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر B۳ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA . . ۶۸

تصویر ۴-۲۸- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر B۴ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA . . ۶۹

تصویر ۴-۲۹- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر C۰ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA . ۷۳

تصویر ۴-۳۰- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر C۱ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA . ۷۳

تصویر ۴-۳۱- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر C۲ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA . ۷۴

تصویر ۴-۳۲- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر C۳ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA . ۷۴

تصویر ۴-۳۳- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر C۴ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA . ۷۵

تصویر ۴-۳۴- الکتروفورز محصولات PCR حاصل از بافر C۵ با رقت‌های تهیه شده از HBV-DNA . ۷۵