٣٨٩٧٤

۱۳۸۰/۱۰/۱۱
مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پایه

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی (ژنتیک)

عنوان:

استفاده از روش DNA واکسن جهت بررسی بیان ژن شماره ۵۲ ویروس واریسلازوستر

نگارش:
هدا آیت

015474
۳۸۶۷۳

استاد راهنما:
جناب آقای دکتر مجید صادقی‌زاده

استاد مشاور:
جناب آقای دکتر منوچهر میرشاهی

تابستان ۱۳۸۰

تأییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعـضـای هیـئـت داوران نـسـخـهٔ نـهایی پایان نامه خـانم/ آقای هدا آیت

تحت عنوان: **استفاده از روش *DNA* واکسن جهت نشان دادن بیان ژن شماره ۵۲ ویروس واریسلازوستر**

را از نظر فرم و محتوات بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجه کارشناسی‌ارشد مورد تایید قرار دادند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبهٔ علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	آقای دکتر مجید صادقی‌زاده	استادیار	
۲- استاد مشاور	آقای دکتر منوچهر میرشاهی	استادیار	
۳- استاد ناظر	آقای دکتر آهنگری	استادیار	
۴- استاد ناظر	آقای دکتر سیدکاظم بیدکی	استادیار	
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی	آقای دکتر سیدکاظم بیدکی	استادیار	

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 ژنتیک *است که در سال* ۱۳۸۰ *در دانشکدهٔ* علوم پایه *دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر مجید صادقی زاده، مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر منوچهر پرشاهی و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر* ——— *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 هدا آیت دانشجوی رشته ژنتیک مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی: هدا آیت

تاریخ و امضا:

تقدیم به

دو اسوهٔ عشق و صبوری

پدر و مادرم

به پاس تمام رنجها، تلاشها و حمایتهای بی‌دریغشان

شاه‌نشین چشم من تکیه‌گه خیال توست

سپاس صمیمانه نثار بزرگوارانی که در طول تحصیل و تحقیق یاور و پشتیبانم بوده‌اند، بخصوص :

استادگرامی جناب آقای دکتر مجید صادقی‌زاده که راهنمایی این پایان‌نامه را بعهده داشتند و همواره از هدایت‌ها و پشتیبانهای دلسوزانهٔ ایشان بهره‌مند بودم.

جناب آقای دکتر منوچهر میرشاهی که از مشاورهٔ راهگشای ایشان برخوردار بودم.

کلیهٔ اساتید محترم گروه زیست‌شناسی که در دوران تحصیل از تجربیات علمی ایشان برخوردار شدم.

مسئول محترم آزمایشگاه ژنتیک سرکار خانم پاکروان که از همکاری و همدلی صمیمانه و دوستانه ایشان برخوردار بودم.

مسئولین محترم آزمایشگاههای بیوشیمی و گیاهی خانمها زرندی و خرمی‌شاد که در تهیه مواد و دستگاههای مورد نیاز همکاری نمودند.

آقای احدی که از همیاری بیدریغشان در طول پایان‌نامه بهره‌مند شدم.

دوستان عزیزم خانمها الهام مرادیان و فرشته شمسی‌پور که از تجربیات و یاری صمیمانه‌شان برخوردار بودم.

از خانم دکتر پناهی و آقای محمد صفاریون بدلیل کمک‌های ارزنده در مراحلی از پایان‌نامه، از خانم شیوا امیرکاوه‌نی بخاطر پشتیبانی صمیمانه‌شان، از همکلاسی‌های محترم خانمها کامکار، مسعودی و آقای حیدری، از کلیه دانشجویان گروه ژنتیک و بیولوژی و تمامی دیگر دوستان و عزیزانی که در پیشبرد این پایان‌نامه مرا یاری نمودند صمیمانه تشکر می‌نمایم.

چکیده

ویروس واریسلازوستر VZV عامل دو بیماری آبله‌مرغان و زونا می‌باشد. این ویروس بر پایهٔ شباهتهای مورفولوژیک به همراه ویروس هرپس سیمپلکس یک HSV-1 و HSV-2 جزء زیر خانواده Alphaherpesvirinae قرار گرفته است. عدم‌وجود مدل حیوانی و تیترکم ویروس آزاد از سلول باعث شناخت کم از بیولوژی مولکول VZV شده است. تشخیص $\frac{1}{3}$ ژنهای VZV و عملکرد آنها از روی شباهت‌شان با توالی‌های مشابه در ژنوم HSV-1 صورت گرفته است. مدل ارائه شده برای همانندسازی DNA در VZV از روی ویروس مشابه آن HSV-1 الگوبرداری شده است. در ویروس HSV-1، هفت ژن لازم برای همانندسازی DNA ویروس پیدا شده‌اند، تمام این ۷ ژن دارای همولوگ در توالی ژنوم VZV هستند. با این وجود آزمایش مشابه برای پیداکردن ژنهای دخیل در همانندسازی VZV DNA به نتیجه نرسید. علت عدم‌همانندسازی وابسته به منشا در VZV یا بدلیل رخ‌دادن جهش در پلاسمیدهای سنتزی و غیرفعال‌شدن آنها یا بدلیل نیاز به ژنهای دیگر دخیل در همانندسازی می‌باشد. هدف این تحقیق بررسی بیان ژن کلون‌شده ۵۲ (جزکمپلکس هلیکاز - پریماز) و اطمینان از بیان و صحت کلوناژ آن بود. به این منظور از تکنیک نوین DNA واکسن استفاده شد. در این روش بدنبال تزریق DNA پلاسمیدی به میزبان و بیان آن در مدل حیوان، پاسخ‌های ایمنی ایجاد می‌شود. تولید آنتی‌بادی بر ضد آنتی‌ژن بیان شده، می‌تواند حضور پروتئین را در *Invitro* مشخص کنند. با توجه به این مسئله پلاسمید pMS52 به همراه پلاسمیدهای دیگر بعنوان کنترل مثبت و منفی به موشهای BAlB/C در سه نوبت تزریق شد. بدلیل غیرترشحی‌بودن پروتئین بیان‌شونده به منظور افزایش تولید آنتی‌بادی، دوز DNA تزریق شده و تعداد تزریقات افزایش یافت. آنتی‌بادی پلی‌کلونال بدست آمده از سرم موش برکاسمیدهای VZV کدکنندهٔ پروتئین طبیعی ۵۲ نیز تست شد و صحت پروتئین بیان شده توسط پلاسمید را تأیید کرد. بعلاوه توانایی این آنتی‌بادی برای تعیین پروتئین UL8 (پروتئین مشابه ۵۲ در HSV-I) ثابت شده که نشاندهندهٔ شباهت ساختمانی و فضایی بین این دو پروتئین وگواهی بر عملکرد مشابه آنها می‌باشد.

فهرست مطلب

عنوان **صفحه**

فصل اوّل : مقدمه

۱-۱- واریسلا زوستر ویروس VZV ۲

۱-۱-۱- تاریخچه ۲

۱-۱-۲- رده‌بندی و تاکسونومی Taxonomy ۲

۱-۱-۳- محدودهٔ میزبان ۳

۱-۱-۴- شاخص‌های رشد درکشت ۴

۱-۱-۵- خواص فیزیکی و حساسیت ۵

۱-۱-۶- شاخص‌های کلینیکی بیماری ۵

۱-۱-۷- زنان باردار و نوزادان ۶

۱-۱-۸- VZV و ایمنی ضعیف ۶

۱-۱-۹- توزیع جغرافیایی و فصلی ۷

۱-۱-۱۰- اپیدمیولوژی ۷

۱-۱-۱۱- مورفولوژی ۷

۱-۱-۱۲- زونا ۸

۱-۱-۱۳- ژنتیک ۱۰

۱-۱-۱۴- رونویسی ۱۱

۱-۱-۱۵- خواص پروتئین‌ها ۱۲

عنوان | صفحه

۱-۱-۱۶- همانندسازی ویروس (Replication) ۱۵
۱-۱-۱۷- نهفتگی ویروس و دوباره فعال‌شدن آن ۱۷
۱-۱-۱۸- پاسخ ایمنی به VZV ۱۹
۱-۱-۱۹- تکامل و گوناگونی در سوش VZV ۲۱
۱-۱-۲۰- پیشگیری و درمان ۲۲
۱-۱-۲۰-۱- داروی ضدویروس ۲۲
۱-۱-۲۰-۲- واکسن ۲۳
۱-۱-۲۱- همانندسازی DNA ویروس ۲۳
۱-۱-۲۱-۱- همانندسازی DNA در HSV-1 ..... ۲۴
۱-۱-۲۱-۲- همانندسازی DNA در VZV ۲۶
۱-۱-۲۲- مروری بر مطالعات گذشته ۲۷
۱-۱-۲۲-۱- همانندسازی DNA در HSV-1 ..... ۲۷
۱-۱-۲۳- هدف ۲۹
۱-۱-۲۴- UL8 در HSV-1 ..... ۳۰
۱-۱-۲۵- پروتئین ORF52 در VZV ۳۱
۱-۱-۲۶- نشان‌دادن بیان پروتئین ۳۱
۱-۲- DNA واکسن ۳۳
۱-۲-۱- مقدمه ۳۳

عنوان **صفحه**

۱-۲-۲- طراحی وکتور برای استفاده بعنوان واکسن ۳۴

۱-۲-۳- تزریق واکسن ۳۶

۱-۲-۴- مدلهای حیوانی ۳۷

۱-۲-۵- مزیت‌های DNA واکسن ۳۸

۱-۲-۶- ایمنی‌شناسی DNA واکسن ۳۹

۱-۲-۶-۱- عرضهٔ آنتی‌ژن ۴۱

۱-۲-۶-۲- ایمنی هومورال ۴۴

۱-۲-۷- افزایش راندمان DNA واکسن ۴۴

فصل دوم : مواد و روشها

۲-۱- کشت باکتری DH5α ۴۹

۲-۱-۱- محیط کشت LB مایع (یک لیتر) ۴۹

۲-۱-۲- محیط کشت LB جامد ۵۰

۲-۱-۳- محیط کشت LB به همراه آنتی‌بیوتیک ۵۰

۲-۲- انتقال پلاسمید به درون باکتری (ترنسفورم‌کردن باکتری) ۵۰

۲-۲-۱- تولید باکتری مستعد (Competent) ۵۱

۲-۲-۲- Transfromation ۵۱

۲-۲- Mini-Prep (تهیهٔ پلاسمید در مقیاس کم) ۵۳

عنوان	صفحه

۲-۳-۱- روش جوشاندن ۵۳

۲-۳-۲- روش فنل کلروفرم ۵۵

۲-۳-۳- روش لیز قلیایی ۵۵

۲-۴- الکتروفورز DNA بر روی ژل آگارز (ژل ۱٪) ۵۷

۲-۵- تهیه DNA از باکتری در مقیاس وسیع (Maxi-Prep) با استفاده از کیاژن ۵۸

۲-۵-۱- اندازه‌گیری غلظت DNA ۶۱

۲-۶- هضم پلاسمید به منظور اطمینان از صحت آن ۶۲

۲-۷- حذف آلودگی پروتئینی با استفاد از روش فنل -کلروفرم ۶۳

۲-۸- کشت سلول ۶۴

۲-۹- پاساژدادن سلول ۶۵

۲-۱۰- فریزکردن سلولها ۶۶

۲-۱۱- واردکردن پلاسمید به درون سلولهای یوکاریوتی به روش فسفات کلسیم ۶۷

۲-۱۲- بررسی بیان پروتئین در سلولهای ترنسفکت‌شده ۶۸

۲-۱۲-۱- جداکردن پروتئین با استات پتاسیم ۶۹

۲-۱۲-۲- رسوب پروتئین با آمونیم سولفات ۷۰

۲-۱۲-۳- رسوب پروتئین با TCA (تری کلرواستیک اسید) ۷۰

۲-۱۳- Dot Blot پروتئین ۷۱

عنوان **صفحه**

۲-۱۴- الکتروفورز SDS-PAGE ۷۳

۲-۱۵- رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل آمید باکوماسی‌بلو ۷۵

۲-۱۶- ایمنوبلاتینگ (وسترن بلاتینگ) ۷۶

۲-۱۷- ایمن‌سازی حیوان آزمایشگاهی با پلاسمید ۷۸

۲-۱۸- خونگیری و تهیه آنتی‌بادی ۷۹

فصل سوم: نتایج

۳-۱- پلاسمیدها و کاسمید ۸۱

۳-۲- تهیهٔ DNA ۸۳

۳-۳- بیان *Invitro* پلاسمید کدکنندهٔ آنتی‌ژن ۸۴

۳-۴- ایمن‌سازی موش ۸۴

۳-۵- تعیین اختصاصی پروتئین بیان شده SDS-PAGE ۸۵

۳-۶- وسترن بلات پروتئین E420, pMS52 ..... ۸۵

۳-۷- بررسی آنتی‌بادی بر پروتئین‌های بیان‌شده با کاسمید ۸۵

فصل چهارم: بحث

۴-۱- بحث ۹۹

فهرست منابع و مآخذ ۱۰۸

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول (۱-۱) ۱۴

جدول (۲-۲) : روشهای مختلف برای افزایش راندمان DNA واکسن ۴۷

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل (۱-۱) : شکل و مورفولوژی ویروس واریسلازوستر..... ۸

شکل (۱-۲) ترتیب ژنوم VZV ۱۱

شکل (۱-۳) : نشان‌دهندهٔ اتصال ویروس به سلول، ورود آن، مراحل رونویسی و ترجمه ویروس و سپس تجمع و خروج ویروس از سلول..... ۱۷

شکل (۱-۴) : نشان‌دهندهٔ کاسمیدهای هم‌پوشان از ژنوم VZV ۲۹

شکل (۱-۵) : نشاندهندهٔ نحوهٔ اتصال UL8 با DNA و دیگر پروتئین‌ها ۳۰

شکل (۱-۶) : طرح شماتیکی از وکتور DNA واکسن ۳۵

شکل (۱-۷) : شمای کلی از تحریک سیستم ایمنی توسط DNA واکسن ۴۱

شکل (۱-۸) : تزریق DNA پلاسمیدی و نحوهٔ عرضهٔ آن ۴۲

شکل (۳-۱) : پلاسمید pRC/CMV-HB..... ۸۱

شکل (۳-۲) : پلاسمید pMS52..... ۸۲

شکل (۳-۳) : نتیجهٔ هضم پلاسمیدهای E420 و E421 با آنزیم EcoRI..... ۸۷

شکل (۳-۴) : نتیجهٔ هضم پلاسمید pMS52 با PstI..... ۸۸

شکل (۳-۵) : Dot blot سلول ترنسفکت‌شده با پلاسمید E420..... ۸۹

شکل (۳-۶) : Dot blot حاصل از pMS52 و E420 با سرم ۲۰ روز پس از تزریق سوم ۹۰

شکل (۳-۷) : Dot blot سلول ترنسفکت‌شده با کنترل مثبت pRC/CMV-HBS..... ۹۱

شکل (۳-۸) : Dot blot حاصل از pMS52 با سرم ۲۰ روز پس از تزریق سوم..... ۹۱

صفحه

عنوان

شکل (۹-۳) : Dot blot حاصل از E420 و E421 با سرم موش تزریق‌شده با E420 ..... ۹۲

شکل (۱۰-۳) : Dot blot پروتئین ۵۲ حاصل از پلاسمید pMS52 و کاسمید pVpme19..... ۹۲

شکل (۱۱-۳) : Dot-blot حاصل از pVpme19، pMS52، pMC160، E420 ..... ۹۳

شکل (۱۲-۳) : SDS-PAGE سلولهای ترنسفکت‌شده با pMS52، E420، کاسمید pVpme19 و pG310..... ۹۴

شکل (۱۳-۳) : نتیجهٔ حاصل از SDS-PAGE..... ۹۵

شکل (۱۴-۳) : نتیجهٔ حاصل از وسترن بلات با سرم موش پس از تزریق سوم ۹۶

شکل (۱۵-۳) : نتیجهٔ حاصل از وسترن بلات ۹۷