٤٣٨٥٠

دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته ویروس شناسی

عنوان :

استفاده از وسترن بلاتینگ به منظور مقایسه ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک با گلیکو پروتئین نوترکیب D ویروس

نگارنده :

زهرا مشکات

۱۳۸۱ /۱۲/ ۱۰

استاد راهنما :

دکتر محمد حسن روستایی

استاد مشاور :

دکتر حوریه سلیمان جاهی

شهریور ۱۳۸۱

۶۳۸۵

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

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد **خانم زهرا مشکات**

رشته: **ویروس‌شناسی** گرایش:

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

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

جناب آقای دکتر محمدحسن روستایی (استاد راهنما)

سرکار خانم سلیمانجاهی (استاد مشاور)

جناب آقای دکتر ... رضایی (استاد ناظر و نماینده تحصیلات تکمیلی)

جناب آقای دکتر محسن کیوانی (استاد ناظر)

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 ویروس شناسی است که در سال ۱۳۸۱ در دانشکدهٔ علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم / جناب آقای دکتر محسن رستمی، مشاورهٔ سرکار خانم / جناب آقای دکتر مسعود سلیمانجاهی و مشاورهٔ سرکار خانم / جناب آقای دکتر مسعود طراوت با مداد 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 زهرا مشّاط دانشجوی رشته ویروس شناسی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام‌خانوادگی: زهرا مشّاط

تاریخ و امضا: ۸۱/۶/۳۱

یا ربّ :

سپاس و شکر به درگاه کبریائیت،که در این راه محبت بی
پایانت را با ذره ذرهٔ وجودم احساس کردم و با محبت
بی دریغت،هیچگاه در تنهائیم ،احساس غربت
نکردم . کمکم کردی تا سختی ها هموار
شود و دشواری ها به انجام رسد .

یاربّ :

یاریم ام کن تا اندوخته هایم را در راه رضایی تو صرف
کنم و در گذرگاه عمر، کمک به مخلوق را
وجهه همتِ خویش قرار دهم .

تقدیم به :

پدر گرامی

مادر مهربان

همسر فداکار

و

دختر عزیزم

بسمه تعالی

من لم یشکر المخلوق ، لم یشکر الخالق

با تشکر و سپاس از :

جناب آقای دکتر محمد حسن روستایی ، استاد راهنمای گرامی و مدیر محترم گروه ویروس شناسی که راهنمایی اینجانب را در طول تحصیل و در طی انجام این پایان نامه بر عهده داشتند واز مساعدت های بی دریغ و راهنمایی های ارزشمند ایشان در طی مراحل انجام این پایان نامه و تحصیل بهره مند شدم.

سرکار خانم دکتر حوریه سلیمان جاهی ، استاد مشاور محترم و خواهر عزیزم ، که در مراحل مختلف این پایان نامه از راهنمایی های ارزشمند ، مساعدت های بی دریغ و دلسوزی های خواهرانه ایشان بهره مند بودم.

سرکار خانم دکتر طراوت بامداد ، استاد مشاور (افتخاری) ، که از راهنمایی های فراوان ایشان در طی انجام این پایان نامه بهره بردم .

جناب آقای دکتر کیوان زندی که از مساعدت های بی دریغ ایشان در مراحل مختلف انجام این پایان نامه بهره بردم.

جناب آقای دکتر پوربخش ، مسئول محترم بخش طیور مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی ، که در مراحل خالص سازی ویروس همکاری نمودند.

برادر عزیزم جناب آقای مجتبی مشکات که از مساعدت ها و کمک های بی دریغ ایشان در انجام تحلیل های آماری این پایان نامه بهره فراوان بردم .

و نیز همه دوستان و همکارانی که در پیشبرد این پایان نامه مرا یاری نمودند .

خلاصه

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک (HSV-1)، ویروسی انولوپ دار با DNA دو رشته ای خطی است که بیماری های مختلفی در انسان ایجاد می کند که از بیماری های خفیف در بسیاری از بیماران تا بیماری های تهدید کننده زندگی در نوزادان و افراد با ایمنی سازشکار دیده می شود .این ویروس حداقل ۱۱ گلیکوپروتئین را کد می کند که گلیکوپروتئین D نقش مهمی در عفونت زایی و پاتوژنز ویروس دارد .

در این پژوهش ، ابتدا HSV-1 تکثیر شد و سپس رقت های متوالی از آن تهیه شد و به یاخته های کلیه گاو(BK)اضافه شد و آخرین رقت ویروس که باعث ایجاد اثرات سیتوپاتیک در یاخته های تلقیح شده گردیده بود ، جمع آوری گردید . این ویروس ها برای تولید آنتی سرم در خرگوش استفاده شد . بدین منظور دو خرگوش سالم و مستعد به کار رفت .برای هر خرگوش سه مرحله تزریق انجام شد . در تزریق اول ، ۱۰۰۰ TCID50 از ویروس به همراه ادجوانت کامل فروند تزریق شد.تزریقات دوم و سوم شامل ۱۰۰۰ TCID50 ویروس به ترتیب با ادجوانت ناقص فروند و با ادجوانت کامل فروند انجام شد .سرم به دست آمده از خرگوش های فوق در آزمایش خنثی سازی ویروس (VNT) استفاده شد .همچنین آزمایش (VNT) برای تشخیص و اندازه گیری آنتی بادی های HSV-1 در ۱۰۰ نمونه سرمی که از افراد مشکوک جمع آوری شده بود، استفاده شد .

به منظور انجام آزمایش وسترن بلاتینگ ، ویروس با شیب غلظت سوکروز سانتریفوژ شد و در آزمایش به کار رفت .

برای مقایسه وسترن بلاتینگ با VNT ، ویروسی که در یاخته های هلا تهیه شده بود،استفاده شد.آزمایش وسترن بلاتینگ روی رقت های ۱۰۰۰ : ۱ ، ۲۰۰۰ : ۱ و ٤۰۰۰: ۱ نمونه های سرم هایی که عیار آنها در آزمایش VNT ۳۲ : ۱ ، ٦٤ : ۱ و۱۲۸ : ۱ بود ، انجام شد و ارتباط بین نتایج وسترن بلاتینگ و VNTمحاسبه گردید . بعلاوه برای تعدادی از سرم هایی که در وسترن بلاتینگ ویروس کامل مثبت بودند ، با همان رقت ها ، آزمایش وسترن بلاتینگ با گلیکوپروتئین نوترکیب D تولید شده در یاخته Sf9 ، انجام شد که نتایج یکسانی نشان داد.

واژه های کلیدی : ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک ، گلیکوپروتئین نوترکیب D ، آزمایش خنثی سازی ویروس ، وسترن بلاتینگ ، خالص سازی ژنتیکی ،

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	۱
فصل دوم: کلیات و مروری بر مطالعات گذشته	۶
۲- ویروس هرپس سیمپلکس	۷
۲-۱-تاریخچه	۷
۲-۲- طبقه بندی	۹
۲-۲-۱- آلفا هرپس ویرینه	۹
۲-۲-۲-بتا هرپس ویرینه	۹
۲-۲-۳- گاما هر پس ویرینه	۱۰
۲-۳- ساختار ویروس	۱۰
۲-٤- ساختار ژنوم	۱۱
۲-٥- پروتئین های ویروس	۱۲
۲-٦-۱- گلیکو پروتئین های غشای ویروس	۱۲
۲-٦-۲- ویژگی های گلیکو پروتئین D	۱۳
۲-۷- تکثیر و هما نند سازی ویروس	۱٦
۲-۸- بیماری زایی ویروس	۱۹
۲-۸-۱- عفونت دهانی هرپس سیمپلکس	۲۰
۲-۸-۲- هرپس تناسلی	۲۱
۲-۸-۳- عفونت های چشمی	۲۲
۲-۸-٤- عفونت های پوستی	۲۲

۲-۸-۵- انسفالیت ۲۳
۲-۸-٦- هرپس نوزادان ۲۳
۲-۸-۷- عفونت در افراد با ایمنی سازشکار..... ۲۴
۲-۹- اپیدمی ۲٤
۲-۱۰- پاسخ ایمنی میزبان ۲۷
۲-۱۱- تشخیص..... ۲۹
۲-۱۲- واکسن ۳۰
۲-۱۲-۱- واکسن های ویروس وحشی..... ۳۱
۲-۱۲-۲- واکسن های غیر فعال شده یا کشته شده ۳۱
۲-۱۲-۳- واکسن های زیر واحدی..... ۳۲
۲-۱۳- درمان ۳۳

فصل سوم : مواد و روش ها..... ۳۵
۳-۱- اهداف کلی تحقیق..... ۳٦
۳-۲- اهداف جزئی تحقیق..... ۳٦
۳-۳- فرضیه ها ۳٦
۳-٤-وسایل و دستگاه های مورد نیاز..... ۳٦
۳-۵- آماده سازی وسایل و مواد مورد نیاز کشت یاخته..... ۳۸
۳-۵-۱- شستشوی وسایل ۳۸
۳-۵-۲- استریل کردن وسایل ۳۹
۳-٦- کشت یاخته..... ۳۹
۳-٦-۱- محیط کشت یاخته ٤۰
۳-٦-۱-۱- بستر کشت ٤۰

۳-۶-۱-۲- ترکیبات محیط کشت ٤١
۳-۶-۱-۳- ترکیب بخش گازی ٤١
۳-۶-۱-٤- درجه حرارت محیط نگهداری یاخته ٤٢
۳-۶-۲- انواع محیط ها و مکمل ها ٤٢
۳-۶-۳- مواد و وسایل مورد نیاز برای تهیه محیط کشت ٤٤
۳-۶-٤- تهیه محیط کشت ٤٤
۳-۶-٥- روش تهیه PBS بدون کلسیم و منیزیم با pH= ۷/۳ ..... ٤٦
۳-۶-٦- روش تهیه محلول تریپسین ورسن ٤٦
۳-۶-۷- روش کشت یاخته ٤٦
۳-۶-۸- پاساژ یاخته ٤٧
۳-۶-۹- منجمد کردن یاخته ها ٤٨
۳-۶-۱۰- تعویض محیط کشت ٤٩
۳-۶-۱۰-۱- روش تعویض محیط ٥٠
۳-۶-۱۱- آلودگی ٥٠
۳-۷- تکثیر ویروس ٥١
۳-۸- کشت یاخته در لوله و میکروپلیت ٥٢
۳-۹- تعیین عیار ویروس ٥٣
۳-۹-۱- تعیین عیار ویروس در لوله های کشت یاخته ٥٣
۳-۱۰- خالص سازی ژنتیکی ویروس ٥٤
۳-۱۰-۱- خالص سازی ژنتیکی ویروس با روش رقت سازی در لوله ٥٤
۳-۱۰-۲- خالص سازی ژنتیکی ویروس با روش برداشتن پلاک ٥٥
۳-۱۰-۲-۱- مواد و وسایل مورد نیاز جهت انجام آزمایش پلاک ٥٦
۳-۱۰-۲-۲- روش آماده سازی محلول های مورد نیاز جهت انجام آزمایش پلاک ٥٧

۳-۱۰-۲-۲-۱- روش تهیه محیط 2x DMEM ۵۷
۳-۱۰-۲-۲-۲- روش تهیه نوبل آگار ۲ درصد ۵۷
۳-۱۰-۲-۲-۳- روش تهیه سرم فیزیولوژی..... ۵۷
۳-۱۰-۲-۲-٤- روش تهیه رنگ قرمز خنثی به صورت استوک ۱۰۰۰ : ۱..... ۵۷
۳-۱۰-۲-۲- روش انجام آزمایش ۵۹
۳-۱۰-۲-٤- رنگ آمیزی..... ٦۰
۳-۱۰-۲-۵- انتخاب و رشد پلاک های مجزا ٦۰
۳-۱۱- آزمایش خنثی سازی ویروس ٦۰
۳-۱۱-۱- مواد و وسایل مورد نیاز جهت انجام آزمایش خنثی سازی ویروس..... ٦۰
۳-۱۱-۲- روش انجام آزمایش خنثی سازی ویروس ٦۱
۳-۱۲- تهیه آنتی سرم ضد ویروس هرپس سیمپلکس انسانی تیپ یک در خرگوش ٦۲
۳-۱۲-۱- انتخاب حیوان..... ۱۳
۳-۱۲-۲- خونگیری از حیوان..... ٦۳
۳-۱۲-۳- روش آماده کردن نمونه جهت تزریق به حیوان ٦٤
۳-۱۲-٤- روش تزریق به حیوان ٦٤
۳-۱۳- خالص سازی ویروس با سانتریفوژ شیب غلظت سوکروز..... ٦۵
۳-۱۳-۱- مواد و وسایل مورد نیاز جهت تخلیص ویروس ٦٦
۳-۱۳-۲- روش تخلیص ویروس با سانتریفوژ شیب غلظت سوکروز..... ٦٦
۳-۱۳-۲-۱- تهیه ویروس مورد نیاز برای مراحل تخلیص..... ٦٦
۳-۱۳-۲-۲- رسوب دادن ویروس ٦۷
۳-۱۳-۲-۳- تهیه شیب غلظت سوکروز و تخلیص ویروس ٦۷
۳-۱٤- آزمایش SDS- PAGE ٦۹
۳-۱٤-۱- مواد و وسایل مورد نیاز برای SDS- PAGE..... ۷۱

۳-۱٤-۲- روش تهیه محلول ها و بافر ها ۷۲
۳-۱٤-۲-۱- محلول ذخیره آکریل آمید ۷۲
۳-۱٤-۲-۲- محلول سدیم دو دسیل سولفات..... ۷۲
۳-۱٤-۲-۳- بافر تریس ۷۲
۳-۱٤-۲-٤- محلول TEMED ۷۲
۳-۱٤-۲-٥- محلول آمونیوم پر سولفات..... ۷۳
۳-۱٤-۲-٦- بافر الکتروفورز تریس گلایسین ۷۳
۳-۱٤-۲-۷- بافر نمونه ۷۳
۳-۱٤-۲-۸- ترکیب ژل متراکم کننده و جدا کننده..... ۷۳
۳-۱٤-۲-۸-۱- ترکیب ژل ۱۲ درصد ۷٤
۳-۱٤-۲-۸-۲- ترکیب ژل ٥ درصد..... ۷٤
۳-۱٤-۳- روش آزمایش SDS-PAGE ۷٤
۳-۱٤-٤- رنگ آمیزی ژل پلی آکریل آمید با کوماسی آبی..... ۷٦
۳-۱٤-٤-۱- وسایل و مواد مورد نیاز جهت رنگ آمیزی..... ۷٦
۳-۱٤-٤-۲- روش رنگ آمیزی..... ۷۷
۳-۱٥- وسترن بلاتینگ..... ۷۷
۳-۱٥-۱- غشاهای مورد استفاده در بلاتینگ..... ۷۸
۳-۱٥-۲- انتقال در تانک..... ۷۹
۳-۱٥-۲-۱- مواد و وسایل لازم جهت انتقال ۷۹
۳-۱٥-۲-۲- روش انتقال..... ۸۰
۳-۱٥-۳- مارکر های پروتئینی..... ۸۱
۳-۱٥-٤- رنگ آمیزی قابل برگشت با پانسو-اس..... ۸۱
۳-۱٥-٥- مسدود سازی غشا..... ۸۱

۳-۱۵-٦- تشخیص با آنتی بادی.....۸۲
۳-۱۵-٦-۱- مواد مورد نیاز جهت تشخیص.....۸۳

فصل چهارم : نتایج.....۸۵
٤-۱- نتایج تعیین عیارویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک به روش ماکرو بااستفاده از یاخته BK.....۸٦
٤-۲-نتایج اولین مرحله آزمایش رقت سازی متوالی.....۹۰
٤-۳-نتایج دومین مرحله آزمایش رقت سازی متوالی.....۹۱
٤-٤-نتایج آزمایش VNT برای سرم خرگوش ها بعد از سومین تزریق.....۹٤
٤-٥-نتایج تعیین عیار ویروس HSV-1 به روش میکرو با استفاده از یاخته هلا.....۹٦
٤-٦- نتایج تست خنثی کنندگی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک انسانی به روش میکرو.....۹۸
٤-۷-نتیجه حاصل از الکتروفورز HSV-1 که در شیب غلظت سوکروز سانتریفوژ شد.....۹۹
٤-۸- نتیجه حاصل از الکتروفورز گلیکو پروتئین های D (تولید شده در سیستم یوکاریوت)و G تولید شده در سیستم پروکاریوت.....۱۰۰
٤-۹- نتیجه آزمایش وسترن بلاتینگ بر روی سرم های مثبت و منفی انسانی و خرگوش با استفاده از HSV-1 که در شیب غلظت سوکروز سانتریفوژ شد.....۱۰۰
٤-۱۰- نتایج آزمایش وسترن بلاتینگ انجام شده بر روی سرم های بیماران ، با استفاده از ویروس خالص شده در شیب سوکروز.....۱۰۱
٤-۱۱-نتایج تعیین عیار ویروس HSV-1 تکثیر یافته جهت انجام آزمایش وسترن بلاتینگ با روش میکرو.....۱۰۲
٤-۱۲-نتیجه وسترن بلا تینگ ویروس HSV-1 تکثیریافته روی یاخته هلا.....۱۰۳

٤-١٣-نتیجه آزمایش وسترن بلاتینگ با ویروس هرپس سیمپکس تیپ یک تکثیر یافته روی یاخته هلا، با رقت های مختلف سرم بیمارانی که در VNT عیار سرم آنها ٦٤ : ١ بود..... ١٠٣
٤ -١٤-نتیجه آزمایش وسترن بلاتینگ با سه رقت مختلف برای سرم بیمارانی که در VNT عیار سرم آنها ٣٢: ١ شده بود..... ١٠٥
٤ -١٥-نتیجه آزمایش وسترن بلاتینگ با سه رقت مختلف برای سرم هایی که درVNT عیار آنها ١٢٨ :١ شده بود..... ١٠٧
٤ -١٦-نتیجه آزمایش وسترن بلاتینگ هفت رقت مختلف برای سرم خرگوش های مثبت و منفی ١٠٨
٤ – ١٧-نتیجه آزمایش وسترن بلاتینگ برای سرم هایی که عیار VNT آنها زیر ٣٢ : ١ می باشد ١٠٩
٤-١٨- بررسی ارتباط آزمایش خنثی سازی ویروس با رقت ١٢٨: ١سرم ها با وسترن بلاتینگ با رقت ٤٠٠٠ : ١همان سرم ها..... ١١١
٤-١٩- بررسی ارتباط آزمایش خنثی سازی ویروس با رقت ٦٤ : ١ سرم ها با وسترن بلاتینگ با رقت ٢٠٠٠ : ١همان سرم ها..... ١١٢
٤-٢٠ -بررسی ارتباط آزمایش خنثی سازی ویروس با رقت ٣٢ : ١ سرم ها با وسترن بلاتینگ با رقت ١٠٠٠ : ١همان سرم ها..... ١١٤
٤-٢١- بررسی ارتباط آزمایش خنثی سازی ویروس توسط رقت های ٣٢ : ١ ، ٦٤ : ١ و ١٢٨ : ١ سرم ها با آزمایش وسترن بلاتینگ توسط رقت های ١٠٠٠ : ١ ، ٢٠٠٠ : ١ و ٤٠٠٠ : ١ همان سرم ها..... ١١٥
٤ – ٢٢-نتیجه آزمایش وسترن بلاتینگ با استفاده از گلیکو پروتئین D نو ترکیب تولید شده در یاخته Sf9 و گلیکو پروتئین G تولید شده در سیستم پرو کاریوت..... ١١٧

فصل پنجم: بحث ، نتیجه گیری و پیشنهاد ها..... ۱۲۱

۵-۱- بحث و نتیجه گیری..... ۱۲۲

۵-۲- پیشنهاد ها..... ۱۳۱

منابع ۱۳۳