SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین روش تحقیق و مقاله نویسی علوم انسانی

کارگاه آنلاین پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

مقايسه مولكولي پروموتر ژنهاي همانند سازي(52 و 16) دو سوش Dumas وOka ويروس آبله مرغان و زونا (VZV)

مستانه ظهری [1]* مجید صادقی زاده [1].خسرو خواجه[2].**
1.دانشگاه تربیت مدرس.دانشکده علوم پایه گروه ژنتیک
Tel : 8011001 – 3487
Email : mzohri82@yahoo.com ,
sadeghma@modares.ac.ir
2.دانشگاه تربیت مدرس دانشکده علوم پایه گروه بیوشیمی
Tel: 8011001- 3470

چکیده:

تحقیقات انجام شده عفونت زایی متفاوتی را در شرایط آزمایشگاه *in vitro*برای دو سوشVZV بنامهای Dumas و Oka نشان داده است .تا کنون عفونت زایی قابل توجهی برای سوش Dumas در آزمایشگاه مشاهده نشده است در حالیکه سوش Oka در همین شرایط عفونت زایي مناسبی داشته است .یکی از دلایل تفاوت میتواند بیان ضعیف ژنهای همانند سازی سوش Dumas نسبت به سوش Oka به علت تفاوت در توالی پروموتر این ژنها باشد.

در این تحقیق تفاوت توالی پروموترها وتاثیر آن در رونویسي و بیان در برخی از ژنهای همانند سازی(ژن16و52) به روش اندازه گیری بیان ژن گزارشگر بررسی شده است. باتوجه به توالی ژنوم VZV (Dumas) 2 جفت آغازگرجهت تکثیر پروموتر ژنهاي 52 و16 طراحی گردید. توسط این آغازگرها ناحیه تقریبی پروموترهای ژنهای 16و52 در سوشهای Dumas و Oka با روش PCR تکثیر شد و پس از تعیین توالی درناقل حاوي ژن گزارشگر Lacz وارد شد و مقایسه قدرت بیان پروموتر ها در سلول Huh7بعد از ساخت این مولکول های نوترکیب به روش اندازه گیري آنزیم بتا گالاکتوزیداز حاصل بررسی شد .

مقایسه مولکولهاي نوترکیب ژن52 نشان داد قدرت پروموتر سوش Oka حدود 4 بار بیشتر ازقدرت پروموتر همین ژن درسوش Dumas مي باشد .همین طور با ورود همزمان ناقل حاوي ترانس اکتیواتور(IE62) و مولکولهاي نوترکیب به سلولهاي Huh7 پروموتر ژن 52 سوش Oka نسبت به پروموتر سوش Dumas نسبت به حالت پایه 10 بار بیشتر متاثر گردید. در بیان ژن گزارشگر توسط پروموترهاي ژن 16 دو سوش تفاوت چنداني مشاهده نشد .

تعیین توالی نوکلئوتیدی ناحیه تکثیر شده ژن 52 نشان داد که دو سوش Dumasو Oka در3 نقطه متفاوت می باشند.در حالیکه در ناحیه تکثیر شده ژن 16 تفاوتی بین دو سوش مشاهده نشد.

بنابراین معلوم گردید پروموتر ژن 52 سوش Oka به دلیل موتاسیون 4 مرتبه فعالتر از این پروموتر در سوش Dumas مي باشد که احتمالا در عفونت زایی سوش Oka موثر است .

کلمات کلیدي : ویروس آبله مرغان وزونا (VZV) ـ پروموتر ـ ترانسفکشن ـ بتا گالاکتوزیداز

مقدمه :

ويروس واريسلا – زوستر عامل مولد آبله مرغان – زونا يك ويروس انساني و عضو خانوادة هرپس ويريده مي‌باشد. [Fields B.N,1996] . رديف كامل نوكلئوتيدي ژنوم VZV (سوية Dumas) توسط داويسون و اسكات در سال 1986 تعيين شد. ژنوم اين ويروس يك مولكول DNA دو رشته اي (3±80 دالتون) خطي است كه 124884 جفت باز طول دارد.[Davison A.J., Scott J.E, 1986] . تعدادي از ژنهاي همانند سازي ويروس نيز از طريق جايگزيني در سيستم شالبرگ شناسايي شده اند .

در سال 1993 دو دانشمند به نامهاي كوهن و سيدل ،چهار كاسيد هم پوشان حاوي ژنوم كامل VZV را ايجاد كردند. اين چهار كاسيد به صورت هم پوشان بود بنابراين حاوي تمامي ژنوم VZV بود بدون اينكه ژني غيرفعال و يا حذف شود اما طي مطالعات كوهن هرگز نتوانست بيان ژنهاي همانندسازي را در اين كاسيدها نشان دهد و ورود همزمان اين چهار كاسيد به درون ياخته ميزبان اثرات CPE را نشان نداد. [Cohen J.I, Seidel K ,1994,1993] در سال 1997 پرفسور جان هي از دانشگاه ايالتي نيويورك، چهار كاسيد هم‌پوشان ديگر ساخت كه حاوي ژنوم كامل سويه VZV Oka بودند. در حضور اين كاسيدها بيان ژن‌هاي همانندسازي و توليد CPE ديده شده است. .

با توجه به اين نتايج اين طور فرض شد كه كاسيدهاي ساخته شده توسط كوهن كه از سوش Dumas تهيه شده اند نسبت به كاسيدهاي ساخته شده توسط جان هي كه از سوش Oka ساخته شده اند متفاوت عمل مي‌نمايند و ضعيفتر بيان مي‌شوند. و اين عدم توليد CPE و بيان مي‌تواند منوط به جهش‌هاي نقطه اي موثر در اين سوش باشد. اولين تصور اينست كه اين تفاوت‌ها مي‌تواند مربوط به توالي پروموتري ژن يا ژنهايي باشد كه در همانندسازي ضرورت دارند در نتيجه رونويسي و بيان آن ژن و يا ژنهاي خاص كاهش يافته و تاثير بر توليد ويريون نيز خواهند داشت. در اين پژوهش با توجه به اين فرضيه برخي از ژنهاي همانندسازي انتخاب گرديد و توالي پروموتر آن ژنها در دو سوش از نظر ترتيب توالي و ميزان رونويسي و بيان مقايسه شد.

مواد وروشها :

تكثير قطعه پروموتر (PCR) :

پرايمرهاي 16ZF,16ZR جهت تكثير پروموتر ژن 16 از روي توالي سوش Dumas براي هر دو سوش طراحي و سنتز گرديد .پرايمرهاي 52ZF,52ZR نيز با توجه به توالي سوش Dumas براي هر دو سوش سنتز گرديد (توالي پرايمرها در صورت درخواست موجود مي باشد) . توسط اين پرايمرها توالي دو سمت ATG تكثير گرديد به طوريكه حدود 100 نوكلوتيد از ناحيه كد شونده نيز همراه پروموتر سنتز شد . به اين ترتيب سعي شد ناحيه پروموتري ژنهاي مذكور كه هنوز شناخته نشده اند به طور كامل پوشش داده شوند. ضمنا به انتهاي5 پرايمرها توالي شناسايي آنزيمهاي PstI , HindIII اضافه گرديد .اين توالي ها به طوري قرار گرفت كه پس از ورود قطعه پروموتر در ناقل جهت رونويسي صحيح باشد .

ساخت پلاسيد هاي نوتركيب :

پلاسيد حاوي پروموتر ژن 52 سوش Oka (pMZ1) : از قرار گرفتن پروموتر ژن 52 سوش Oka در سايت پروموتر ژن بتا گالاكتوزيداز ناقل بياني ايجاد شد .

پلاسيد حاوي پروموتر ژن 52 سوش Dumas (pMZ2) : از قرار گرفتن پروموتر ژن 52 سوش Dumas در سايت پروموتر ژن بتا گالاكتوزيداز ناقل بياني ايجاد شد .

كشت سلول يوكاريوتي:

سلولهاي Huh7 در محيط DMEM حاوي 5٪ سرم كشت داده شد . اين سلولها پس از تكثير به تعداد كاملا برابر به ظروف شش خانه مخصوص ترانسفكشن انتقال يافت .در زمان ترانسفكشن سلولها تقريباً تمام سطح ظرف را پوشانده ولي هنوز فضاي كافي براي رشد داشتند .

ترانسفكشن :

انتقال DNA مورد نظر (pMZ1,pMZ2,....) با روش شيميايي ايجاد رسوب فسفات كلسيم در روش وابسته به مقدار (Dose dependent) با مقادير متفاوت(5-10-15 ميكروگرم) DNA پلاسيدي انجام شد .

تهيه عصاره سلولي :

سلولهاي ترانسفكت شده پس از 48 ساعت جهت استخراج آنزيم توليد شده استفاده شد .اين سلولها با روش انجماد و ذوب بدون استفاده از مواد شيميايي گسسته شد و آنزيم در بافر مناسب Tris-cl (0.2M) سرد آزاد گرديد .

بررسي كمي آنزيم بيان شده :

پس از تهيه عصاره سلولي حاوي آنزيم ، جهت بررسي كمي آنزيم مقدار 30 ميكرو ليتر از عصاره ،در مجاورت 66 ميكروليتر از ONPG 1x در حجم نهايي 300 ميكروليتر بافر مناسب فعاليت انزيم در دماي 37 درجه قرار گرفت .

رنگ زرد ايجاد شد وسپس واكنش با كربنات سديم متوقف شد . جذب رنگ زرد در 420 نانومتر اندازه گيري شد .

نتايج و بحث:

پلاسيد pMZ1 در مقادير 5-10-15 ميكروگرم وارد سلولها گرديد ميزان آنزيم متناسب با مقادير DNA افزايش يافت .در اثر ورود همزمان پلاسيد pMZ1 (5-10-15 ميكروگرم) و pCMV62 (ترانس اكتيواتور) در ميزان آنزيم توليد شده به ترتيب افزايش مشاهده گرديد در اين حالت حدوداً 10 بار بيش از حالت بدون ترانس اكتيواتور آنزيم مشاهده گرديد .

پلاسيد pMZ2 در مقادير 5-10-15 ميكروگرم وارد سلولها شد كه همانند pMZ1 به ترتيب آنزيم توليد شده افزايش نشان داد در اثر ورود همزمان پلاسيد وترانس اكتيواتور نيز تقريبا 10 بار آنزيم بيشتر مشاهده شد .

در مقايسه ميزان انزيم توليد شده توسط مقادير يكسان pMZ1,pMZ2 مشاهده شد كه pMZ1 نسبت به pMZ2 حدوداً 4 بار فعالتربوده است . نتايج تعيين توالي پروموتر هاي 52 سوش Oka و Dumas نيز در سه نقطه تفاوت نشان داد كه بنا به نتايج بدست آمده مي توان گفت تفاوتهاي مشاهده شده در محلهاي موثر بر رونويسي واقع گرديده و بر ميزان رونويسي موثر بوده است .بنا براين احتمالا موتاسيونها سبب كاهش رونويسي توسط پروموتر 52 سوش Dumas گرديده اند . اما اين موتاسيون بر عملكرد ترانس اكتيواتور تاثيري نداشت . در مورد فعاليت پروموتر 16 سوش هاي Oka وDuams تفاوت چشمگيري مشاهده نشد .

قدرداني و تشكر:
از سركار خانم دكتر بامداد به خاطر اهدا پلاسميد بياني سپاسگزارم.

منابع:

1. Fields B.N. Fileds virology. 3rd edition, U.S.A: Lippincott Raven publishers, pp. 2425-2541, 1996.
2. Davison A.J., Scott J.E. The complete DNA sequence of varicella – zoster virus. J. Gen. Virol, 67: 1760-1816, 1986.
3. Cohen J. L., Heffel D. and Seidel K. The Transcriptional Activatio Domain of Varicella – zoster virus open Reading Frame 62 protein is not conserved with its Herpes simplex virus Homology. J. Virol. 4246-4251, 1993.
4. Cohen J.I., and Seidel K. Varicella –Zoster Virus (VZV) Open Reading Frame 10 protein .The Homolog of the Essential Herpes Simplex Virus Protein VP16, is Dispansable for VZV Replication invitro. J. Virol., 7850-7858, 1994.
5. Perera P., The TATA motif specifies the Differential Activation of minimal promoters by Varicella Zoster Virus Immediate – early Regulatory Protein IE62. J. Biol Chen, 275:487-496, 2000.

on. Genvirol, 2957-2967, 2003.

Abstract:

Molecular comparison of promoter region of Varicella Zoster Virus (VZV) Oka and Dumas strains replication genes, 16 and 52.

Mastaneh Zohri[1], Majid Sadeghizadeh[1] , Khosro Khajeh [2]
1 .Tarbiat Modares University, science faculty, department of genetics, Tehran, Iran
2 .Tarbiat Modares University, science faculty, department of biochemistry, Tehran, Iran

Current investigations indicate different *in vitro* infection patterns for Oka and Dumas strains. Infection of cells in culture with Dumas strain produces lower number of infectious particles while the Oka strain is highly infectious *in vitro*. It is postulated that weak expression of the replication genes in Dumas strain may be the reason for the attenuated phenotype.

The objective of this study is to analyze the sequences of the promoter region in two of the VZV replication genes, 16 and 52 by studying the level of expression of a reporter gene.

For this purpose, primers were designed from VZV published sequences to amplify the promoter regions of both genes using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. The amplicons were cloned in a *lacZ* reporter vector. Cotransfaction of 52-Oka reporter plasmid with virus major trans-activator (IE62) in Huh7 cells showed that the presence of 52-Oka promoter was up regulated by the IE 62 trans-activator in a dose dependent manner resulting in ß-gal levels approximately 4-fold higher than those observed with 52-Dumas promoter and 10-fold higher than basal levels. In addition cotransfection of 16-Oka reporter plasmid did not show any significant change in activity in comparison with 16-Domus-reporter plasmid.

Sequence determination of the promoter region in gene 52 indicated differences in 3 nucleotides in Dumas strain compared to Oka strain while no change was observed in the promoter sequences of gene 16 of the two strains.

It is hence postulated a relationship between mutations in the Dumas promoter of replication genes, and the lower infectivity of the Dumas strain.

SID

فیلم های آموزشی

عضویت در خبرنامه

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

سرویس های ویژه

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی

کارگاه آنلاین آشنایی با پایگاه های اطلاعات علمی بین المللی و ترفند های جستجو

کارگاه آنلاین
روش تحقیق و مقاله نویسی علوم انسانی

کارگاه آنلاین
پرپوزال نویسی و پایان نامه نویسی