Archive of SID

مقاله پژوهشی

تعیین نیمه کمی میزان بیان mRNA اینترفرون گاما با استفاده از روش RT-PCR

دکتر جلیل توکل افشاری* ، علیرضا زمانی ، دکتر جواد بهروان*** ، دکتر بهروز شیشه ئیان **** بیتا سیفی*****

چکیده:

سایتوکاینها واسطه های شیمیائی هستند که از سلولهای سیستم ایمنی ترشح شده، و بر سلولهای دیگر یا خود سلول ترشح کننده اثر می کنند. بیان متفاوت ژن سایتوکاینها در بدن مشخص کننده نوع پاسخ ایمنی (از نوع Th1 یا Th2) است که خود این پاسخ متفاوت می تواند نقش مهمی در پاتوژنز بیماریها داشته باشد. از عمده ترین سایتوکاینهای سلولهای Th1 می توان به IFN-γ و IL-2 اشاره کرد. که در پاسخهای ایمنی علیه پاتوژنهای داخل سلولی شرکت می کنند. با توجه به اینکه بیان ژن سایتوکاینها منجمله اینترفرون موقتی بوده و در یک مدت زمان محدود می باشد ، به این علت لازم است بیان ژن آنها (مقدار mRNA) توسط روشهای حساس و دقیقتری همانند RT-PCR اندازه گیری شود .بعلاوه تعیین زمان مورد نیاز جهت ماگزیمم بیان ژن می تواند در مطالعات کلونینگ و استعداد ابتلا به بیماریها در بعضی ازافراد کاربرد داشته باشد.

بعد از کشت لنفوسیتها در حضور PHA (Phytohaemagglutinin) (با غلظت $1\mu g/10^6 cell$) در زمانهای متفاوت (۰،٤،۸،۱۲،۲٤،٤۸،۷۲ ساعت) و استخراج RNA توتال از آنها و سنتز cDNA تک رشته ای اقدام به انجام RT-PCR شد. چون در تمام ساعات انکوبه جواب مثبت بود لذا در مرحله بعدی اقدام به تیتراسیون cDNAحاصل با ضریب رقت ۱/۲ (رقتهای متوالی ۱/۲، ۱/٤، ۱/۸،و....) شد. بر روی ژل الکترفورز(۲٪) قطعه مورد نظر (273bp) مشاهده شد.

نتایج بدست آمده از RT-PCR و Semi-quantitative-RT-PCR نشان می دهد بعد از چهار ساعت انکوباسیون لنفوسیتها با PHA ، بیشترین بیان ژن را دارند(تیتر cDNA=512) و معمولاً بعد از گذشت ۲٤ ساعت مقدار آن به سطح اولیه (قبل از تحریک) بر می گردد.

با توجه به نتایج فوق و مقایسه آن با نتایج محققین دیگر می توان گفت روش RT-PCR حساسترین روش سنجش بیان ژن جهت سایتوکاینهاست و بیان ژن اینترفرون بعد از گذشت چهار ساعت انکوبه به ماکزیمم می رسد. بنابر این مدت زمان انکوباسیون با PHA جهت بررسی اثر عوامل مختلف بر تولید و بیان ژن اینتر فرون گاما زمان ایده آلی است.

کلید واژه ها: اینترفرون گاما / لنفوسیتهای فعال شده با PHA / واکنش زنجیره پلیمراز

* استادیار گروه ایمنولوژی مرکز تحقیقات ایمونولوژی پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** عضو هیأت علمی گروه ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

*** استادیار گروه بیوتکنولوژی پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

**** استادیار گروه ایمنولوژی و هماتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

***** کارشناس ارشد هیستولوژی پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه :

امروزه یکی از مباحث نوین بیولوژی ملکولی، ژنتیک و پزشکی بررسی میزان بیان ژنها در شرایط مختلف سلامت و بیماری است. بیان متفاوت سایتوکاینها (ملکولهای گلیکوپروتئینی که از سلولهای سیستم ایمنی ترشح شده و بر سلولهای دیگر یا خود سلول ترشح کننده اثر میکنند) در بدن مشخص کننده نوع پاسخ ایمنی (از نوع Th1 یا Th2) است. می توان اثر این عوامل را در بدن یا در محیط کشت سلولی مطالعه کرد. بنظر می رسد اینترفرون گاما(اینترفرون ایمن= اینترفرون تیپ II) بعنوان خط مقدم سایتوکاینهای بدن و ایمنی سلولی در ساعات اولیه تحریک سیستم ایمنی (بوسیله آنتی ژن، میتوژن و یا قسمتهای ناشناخته میکروبها) توسط لنفوسیتها ترشح می شود(۱).

از نظر ساختمانی اینترفرون گاما ملکول همودایمری است که هر زیر واحد آن بین ۲۱ تا ۲۴ کیلو دالتون وزن دارد. لذا همودایمر آن با قند اتصال یافته بدان ۵۰ کیلودالتون می شود. این ملکول توسط ژن منفردی بر روی کروموزوم ۱۲ انسان کد می شود. ژن اینترفرون گاما حاوی چهار اگزون(114bp)I، (69bp)II، (183bp)III و (135bp)IV است که توسط سه اینترون (1239bp)A، (95bp)B و (2425bp)C از هم جدا شده اند(۲).

PHA (Phytohaemagglutinin) (نوعی لکتین حاصل از لوبیای قرمز) توانائی تحریک لنفوسیتهای T را در محیط کشت داشته و از دو طریق باعث فعال شدن آنها می شود. ۱- با اتصال به ملکولهای TCR و CD_2 سطح لنفوسیتها و تجمع آنها در نقطه ای از سطح سلول، بعبارت دیگر PHA در اینجا عمل آنتی ژن را تقلید می کند ۲- از مسیری جدا از TCR و با خاصیت میتوژنی خود به گیرنده های میتوژنی سطح سلولT متصل شده و آنها را فعال می کند (۵-۳).

جهت تعیین مقدار سایتوکاینها می توان به طرق زیر عمل کرد:

۱- Bioassay: این روش بیشتر جهت ارزیابی عملکرد و فعالیت سایتوکاینها در محیط کشت سلولی بکار می رود(۶).

۲- Protein assay: در این روش فقط حضور فیزیکی سایتوکاین و توده پروتئینی آن توسط تستهائی چون الیزا و رادیوایمنواسی سنجیده می شود(۷).

۳- امروزه بیشتر از روشهائی استفاده می شود که میزان پیام (mRNA) حاصل از بیان ژن را اندازه گیری می کنند. یکی از معایب این سنجش آن است که اصولاً بخاطر وجود عناصر تکراری AUUUAدر ناحیه (Non-Coding)3′ ملکول mRNA سایتوکاینها ناپایدارند (۸). بعلاوه ژن سایتوکاینها بصورت گذرا در سطح کم بیان می شوند(۹). این روشها شامل:

الف- RT-PCR: . در RT-PCR مراحل سنتز cDNA و آمپلی فیکاسیون (PCR) با همدیگر ترکیب شده اند. چون آنزیم Taq نمی تواند mRNA را بصورت الگو قرار دهد لذا لازم است نخست توسط آنزیمهای نسخه بردار معکوس ناشی از ویروسهائی مثل M-Mulv و AMV ملکول mRNA به cDNA تبدیل شود و سپس PCR معمولی انجام شود(۱۰).

ب- Quantitative-RT-PCR: RT-PCR کمی جهت برآورد میزان DNA یا RNA موجود در یک محلول بکار می رود(۱۳-۱۱). یکی از روشهای ساده جهت انجام RT-PCR کمی ایجاد رقت سریال از DNA یا cDNA اولیه است و سپس انجام PCR با هریک از این رقت هاست. آخرین رقتی که باند قابل رویت ایجاد کرد بعنوان تیتر مورد نظر سنجیده می شود. مثلاً اگر آخرین رقت ۱/۵۱۲ باشد تیتر آن ۵۱۲ در نظر گرفته می شود و نشان می دهد مقدار cDNA اولیه آن خیلی بیشتر از cDNA اولیه تیتر ۱۶ است (۱۶-۱۴،۱۰). عموماً چون اکثراً تعداد سلولها و نمونه های بدست آمده از بیماران محدود است لذا بنظر می رسد که سنجش توسط RT-PCR (یک روش حساس و مفید)بهترین روش تعیین مقدار mRNA و در نهایت بیان یک ژن باشد(۱۷،۱۸).

ج- Microarray: این روش جهت مطالعه بیان ژن در مقیاس وسیع بکار می رود لذامی توان بیان چندین ژن را همزمان با همدیگر مقایسه کرد(۱۹،۲۰).

د-Northern blotting و RNase protection: قبلاً کاربرد زیادی در اندازه گیری مقدار پیام ناشی از بیان ژن داشته ولی امروزه بخاطر وقت گیر بودن، سختی کار و دقیق نبودن کمتر استفاده می شود(۱۱).

هدف از این تحقیق تعیین زمان مورد نیاز جهت بالاترین بیان ژن اینترفرون گاما توسط لنفوسیتهای کشت داده شده در حضور PHA است. بدست آوردن این زمان

www.SID.ir

Archive of SID

می تواند در مطالعات اثر عوامل مختلف مثل ویروسها، داروها . . . بر بیان اینترفرون گاما در محیط کشت مفید باشد. بعلاوه در کلونینگ و بیان ژن اینترفرون در سلولهای یوکاریوت کاربرد زیادی داشته باشد.

روش کار:

جداسازی لنفوسیتهای خون محیطی و تحریک آنها توسط PHA : در شرایط کاملاً استریل مقدار ۱۰ میلی لیتر خون به همراه ۱ میلی لیتر ماده ضد انعقاد(10%EDTA) از فرد سالم گرفته شد. خون حاصل با محلول شستشوی هنکس(۱به ۲) رقیق شده سپس لنفوسیتها با استفاده از شیب غلظت بر روی فایکول جدا شدند. لنفوسیتها را با محلول هنکس ۲ بار شستشو داده و تعداد ۲/۵ میلیون لنفوسیت وارد هر یک از چاهک های پلیت کشت سلولی شش خانه شدند. به هریک از چاهک ها مقدار ۳ میلی لیتر محیط کشت $RPMI_{1640}$ کامل (حاوی 20% FCs, 100 u/ml penicillin G و 100 µ/ml Streptomycin) و ۳۰۰ میکرولیتر محلول PHA (با غلظت PHA10 µg/ml) اضافه شد. بعد از انکوباسیون در زمانهای مختلف (۴،۸،۱۲،۲۴،۴۸،۷۲ ساعت) در انکوباتور 5% CO2 اقدام به انجام تست Viability شده و در صورتی که سلولهای زنده بیش از ۹۰٪ بودند (سلولهای مرده فاقد mRNA هستند) اقدام به جداسازی RNA توتال از سلولها شد. لازم به ذکر است RNA سلولهای زمان صفر بدون انکوبه جدا شدند(۱۷).

استخراج Total RNA و سنتز cDNA تک رشته ای: بعد از سپری شدن زمانهای انکوباسیون، سلولها سانتریفوژ شده و محیط روئی سلولها دور ریخته شد. سلولها دو بار توسط محلول هنکس شستشو داده شدند (شستشو زیاد mRNA را تخریب می کند). پلت حاصل از سلولها را با ۱ میلی لیتر از محلول Trizol همراه کرده و ۲۰۰میکرولیتر کلروفورم بدان اضافه شد. این دو محلول باعث دناتوره شدن سلولها و آزاد شدن RNA، DNA و پروتئینها می شود. سانتریفوژ محلول فوق در دور ۱۴۰۰۰ دو فاز تشکیل می دهد. فاز بالائی (فازآبی)حاوی RNA و فاز پائینی (فاز آلی) حاوی DNA و پروتئین است. بعد از جدا کردن فاز بالائی RNA محلول در آن توسط Isopropyl alcohol سرد رسوب داده شد. بعد از رسوب، RNA توسط اتانل ۷۰٪ (با آب DEPC) شستشو داده شد (یکبار). سپس RNA حاصل در ۱۵ میکرولیتر آب مقطر دارای DEPC حل شد. جذب RNA در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ جهت تعیین مقدار RNA و احتمال آلودگی با پروتئینها محاسبه شد. لازم به ذکر است تمام مراحل استخراج RNA در ۴ درجه سانتیگراد انجام شده است(۱۷). ۱ میکروگرم توتال RNA جهت سنتز cDNA تک رشته ای (برای هریک از زمانهای انکوباسیون)لازم است. لذا حجم مورد نیاز از محلول RNA حاوی این مقدار محاسبه شد. سپس نصف مقدار RNA پرایمر $Oligo_{(dT)}$ بدان اضافه شد و محلول حاصل ۵ دقیقه در حرارت ۷۰ درجه قرار گرفت بعد از سرد کردن آن روی یخ dNTP(1mM)، مواد بافرتریس(غلظت نهائی 1X) ، RNase inhibitor(40 u/20µl) اضافه شد و ۵ دقیقه در ۳۷ درجه قرار گرفت سپس 200u از آنزیم M-Mulv به میکرتیوب اضافه شد (حجم کل کوکتل ۲۰ میکرولیتر) کوکتل مورد نظر در ۳۷ درجه بمدت یک ساعت انکوبه شد. در آخر نیز جهت خنثی شدن آنزیم ، محلول را بمدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه قرار دادیم(در صورتی که آنزیم غیر فعال نشود در مرحله PCR باعث ایجاد باندهای غیر اختصاصی می شود). برای نگهداری، cDNAتولید شده در۲۰- درجه قرار گرفت.

PCR: هر محلولPCR(کوکتل) بمقدار ۲۰ میکرولیتر شامل:$Tris(pH=8\ in\ 20^0C)$،$MgCL_2(2mM)$، dNTPmix (0.8mM) (dATP,dTTP,dGTP,dCTP هر کدام با غلظت 0.2mM)، Taq DNA polymerase (o.5 u/20µl)، cDNA (2µl) و جفت پرایمرهای :

Sence: 5-AAT GCA GGT CAT TCA GAT G-3,
Anti-sence:5-TTG GAC ATT CAA GTC AGT T-3
(که قطعه ای بطول 273bp را زیاد می کنند) تهیه شدند.

شرایط ترمال سایکلر بعد از بهینه سازی شامل:
(Start cycle:94^0C 5 min), (40cycles: 94^0C 45sec, 55^0C 1 min, 72^0C 1 min)(end cycle: 72^0C 5 min)
بود. بعد از اتمام کار جهت افزایش محلول لوله های اپندورف سانتریفوژ شد.

Semi-Quantitatve-PCR: ممکن است حین استخراج، مقادیرمتفاوتی ازRNA از هر پلیت کشت سلولی بدست آید. لذا جهت یکسان کردن تمام RNA بکار رفته برای ساخت cDNA مقدار ۱ میکروگرم از توتال RNA بکار رفت (۱۴). از cDNA سنتز شده با ضریب رقت ۱/۲ رقت های متوالی

www.SID.ir

Archive of SID

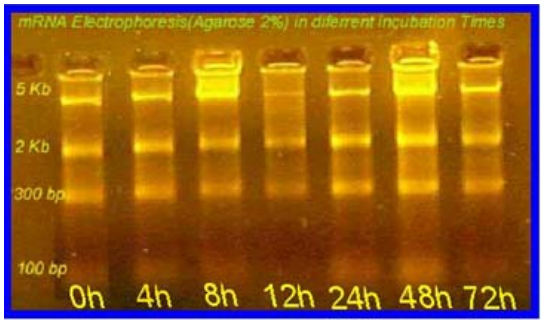
(1/2,1/4,1/8,16,1/32,1/64,....)تهیه شد. برای هریک از این رقتها در اپندورف جداگانه ای PCR انجام شد. در نهایت تیتر نهائی از cDNA که می توانست باند قابل رویت در ژل ۲٪ ایجاد کند بعنوان تیتر بدست آمده برای آن انکوباسیون لنفوسیت در نظر گرفته شد(۱۳،۲۰،۲۱).

ژل الکتروفورز: مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR با یک میکرولیتر ازبافر نمونه (6x buffer:0.25% Bromophenol, o.25% xylen cyanol,15% ficol$_{400}$) بر روی ژل آگاروز ۲٪ بارگذاری شد. جهت تهیه ژل آگاروز از بافر TAE (PH=8 Tris glacial acetic acid and EDTA) استفاده شده و قبل از بسته شدن ژل بدان اتیدیوم بروماید (1µg/15ml) اضافه شده است. بعد از بارگذاری محصول، ژل در تانک الکتروفورز افقی که حاوی بافر TAE بود قرار داده شد و جهت الکتروفورز جریان مستقیم ۸۰ ولت بمدت ۳۰-۲۵ دقیقه استفاده شد. DNA بخاطر دارا بودن بار منفی بسمت قطب مثبت حرکت می کند و بعد از گذشت زمان لازم باندهای حاصل توسط دستگاه ترانس لومیناتور و اشعه UV بررسی شدند. جهت عکس برداری از باندها و انتقال آنها به کامپیوتر از دوربین دیجیتال کداک استفاده شد.

نتایج :

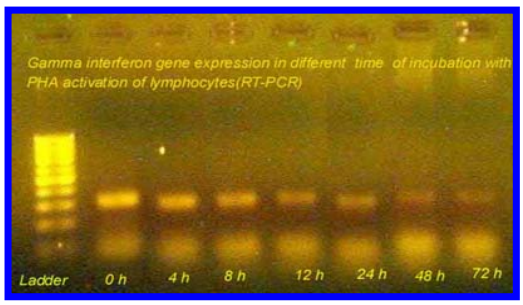
نتایج بدست آمده شامل:

۱- توتال RNA بدست آمده از کشت لنفوسیتها (در ساعات مختلف) در حضور PHA شامل چهار باند است که بترتیب از بالا به پائین شامل 5Kb، 2Kb، 300bp و 100bp هستند. جایگاه این باند ها بترتیب نشان دهنده RNA های 28 S، 18 S، 5 S و tRNA سلولهای یوکاریوتی است. اکثر mRNA ها باید در ناحیه 18 S و 5 S باشند(شکل ۱).



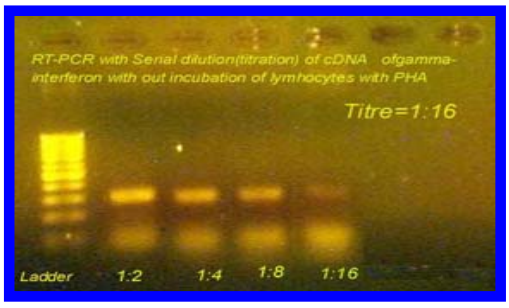
شکل ۱: الگوی الکتروفورزی RNA توتال استخراج شده در ساعات مختلف انکوباسیون

۲- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات RT-PCR بدست آمده از لنفوسیتهائی که در ساعات مختلف با PHA انکوبه شده اند. (بدون آنکه رقت تهیه شود) نشان می دهد که در تمام ساعات حتی در ساعت صفر نیز ژن اینترفرون بیان شده است(شکل ۲).

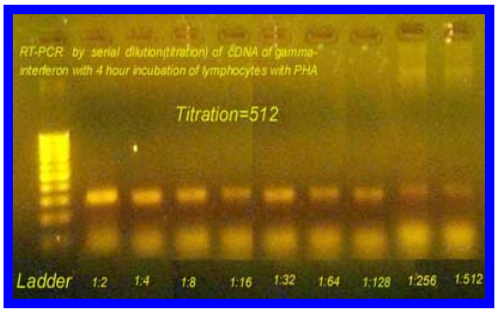


شکل ۲: الگوی الکتروفورزی محصولات PCR از ساعات مختلف انکوباسیون(بدون تهیه رقت)

۳- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات RT-PCR از لنفوسیتهائی که مدت زمانهای مختلف با PHA انکوبه شده اند به تفکیک ساعات انکوباسیون مختلف و تهیه رقت سریال (با ضریب رقت ۱/۲)از cDNAنشان می دهد که بیشترین بیان ژن را در ۴ ساعت انکوباسیون با تیتر ۵۱۲ داشته ایم . تیتر ساعات مختلف بترتیب 0h=16(شکل3a)، 4h=512(شکل3b)، 8h=64(شکل3c)، 12h=64(شکل3d)، 24h=64(شکل3e)، 48h=32(شکل3f) و 72h=16 (شکل3g) است.



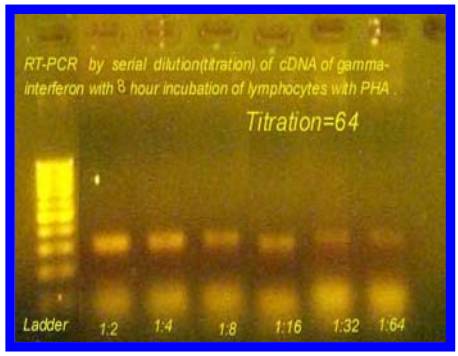
3a-without incubation



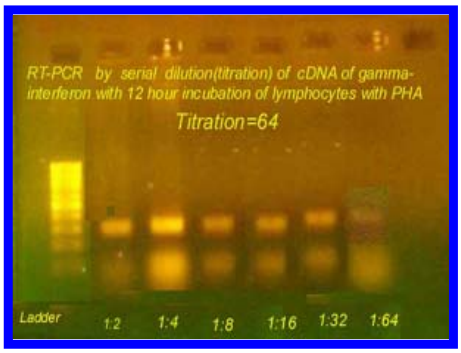
3b- 4h incubation

www.SID.ir

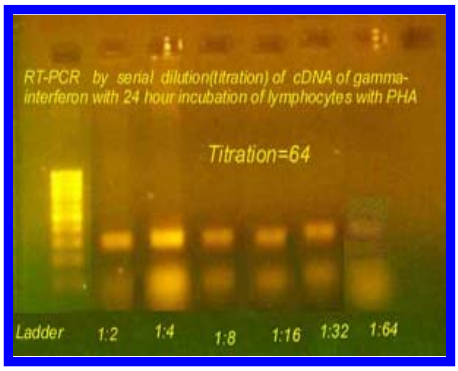
Archive of SID



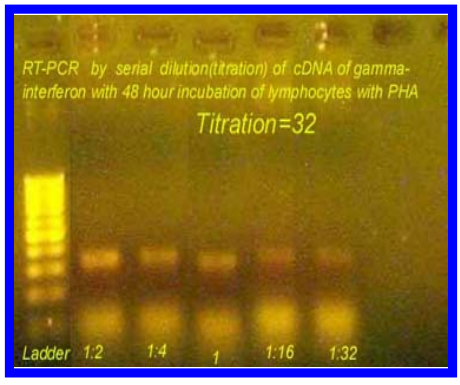
3c- 8h incubation



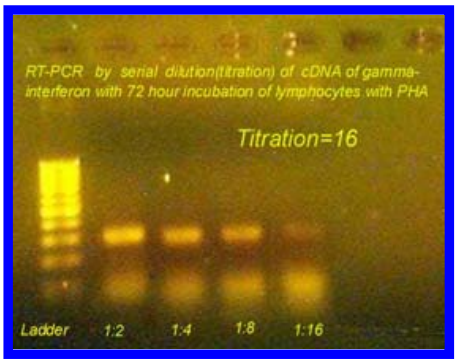
3d-12h incubation



3e-24h incubation

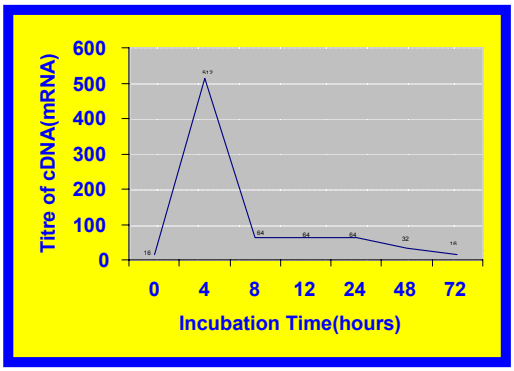


3f-48h incubation



3g-72h incubation

۴- مدتی بعد از افزودن PHA به محیط کشت، لنفوسیتها فعال شده و شروع به بیان ژن اینترفرون می کنند که بالاترین بیان ژن (مقدار mRNA) بعد از گذشت ۴ ساعت از فعال سازی است و سریعاً مقدار آن بحالت طبیعی بر می گردد(نمودار ۱).



نمودار ۱ : تغییرات میزان بیان mRNA ژن اینترفرون گاما در لنفوسیتها برحسب زمان انکوباسیون با PHA

بحث:

همانطور که ملاحظه شد ژن اینترفرون در یک محدوده وسیعی در حضورPHA بیان شده است. حتی بدون انکوباسیون با PHA هم mRNA این ژن با استفاده از روش RT-PCR قابل اندازه گیری است. ۴ ساعت تحریک لنفوسیتها با PHA کافی است تا مقدار mRNA سلول را به بالاترین حد خود یعنی تیتر۵۱۲ برساند. بخاطر ناپایدار بودن mRNA این تیترسریعاً کاهش یافته و به مقدار ۶۴ می رسد. ولی هنوز تقریباً ۲۲ ساعت وقت لازم دارد به سطح اولیه قبل از تحریک یعنی تیتر ۱۶برسد. چونکه وجود تحریک مداوم توسط PHA در محیط کشت باعث شده است تا بیان مختصری از ژن را

www.SID.ir

Archive of SID

داشته باشیم. لازم به ذکر است که در بدن بعد از بیان سریع و برق آسا ژن سایتوکاینها و بعلت ناپایدار بودن mRNA در صورتی که عامل مهاجم از بدن پاک شده باشد (عامل تحریک لنفوسیتها) سریعاً سطح سایتوکاین به مقدار اولیه خود بر می گردد. در غیر این صورت این بیان طولانی مدت ژن سایتوکاینها باعث ایجاد بیماریهای اتوایمن و آلرژی خواهند شد. بعلاوه سایتوکاینها ملکول پیش ساخته ای نیستند و قابلیت ذخیره شدن در سلول را هم ندارند(۱).

بررسی متون گذشته نشان می دهد که Taniguchi و همکاران که در سال ۱۹۹۴ با استفاده از الیزا به همین نتیجه رسیده اند. ولی در مطالعه خود تیتر mRNA بدون انکوباسیون را در حد صفر گزارش کرده اند(۱۷). این اختلاف را می توان چنین تفسیر کرد که اولاً روش آنها (Eliza) حساسیت کمتری نسبت به روش RT-PCR داشته است لذا نتوانسته اند مقادیر کم mRNA را شناسائی کنند. بعلاوه در تعدادی از افراد سالم ژن IFN-γ توسط لنفوسیتهای خون محیطی حتی بدون انکوباسیون هم بیان می شود(۹،۱۴،۲۲).

بیان ژن سایتوکاینها در لنفوسیتهای خون محیطی توسط گروههای دیگری نیز سنجیده شده اند که نتایج گاهی با هم متفاوت هستند تفاوتهای مختصر در این مورد را می توان به شرایط مختلف کشت و روشهای اندازه گیری استفاده شده نسبت داد. لازم به ذکر است که هیچکدام از محققین قبلی نامبرده با روش RT-PCR (دقیق ترین و حساس ترین روش موجود حال حاضر)اقدام به سنجش mRNA در سلولهای کشت داده شده در حضور PHA ننموه اند (۱۸-۱۴).

منابع :

1. Abbas A K, Lichman A H, Pober J S. Cellular and molecular immunology. 4th ed. Philadelphia : W.B. Saunders , 2000 :260-1
2. Gray PW , Goeddel DV. Structure of the human interferon gene. Nature 1982; 298: 859-63.
3. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. 6th ed. London : Mosby , 2001; 117
4. O'flynn K, Krensky AM, Beverly PC. PHA activated of T-cells through the sheep red blood cell receptor. Nature 1985; 313 (6004): 686
5. Pravica V, Asderakis A, Perrey C. Invitro production of IFN-gamma correlates with CA repeats polymorphism in the human IFN-gamma gene. Euro J Immunogenet 1999 Feb; 26(1):1-3
6. Meager A. Biological assays for interferons. J Immunol Methods 2002 Mar ; 1261(1-2):21-36 Review
7. Kopp W , Reynold C , Ruscetti F. The immunoassay of cytokines and growth factors in biological fluids. Dev Bio Stand 1999; 97: 29-37 Review
8. Shaw G, Kamen R. A conservative AU sequence from the 3′- untranslated region of GM-CSF mRNA mediated selective mRNA degradation. Cell 1986; 4: 659
9. O'Garra A, Vieira P. PCR for detection of cytokine gene expression. Curr Opi Immunol 1992; 4:211
10. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001: 2,8,86-8,96
11. Wang AM, Burakoff SJ. Quantitation of mRNA by PCR. Proc Natl .Acad Sci 1989; 86: 9717
12. Ullmann S, Schroder SS, Fisch E. Improvements in quantitative real-time RT-PCR with qiagen, omniscript and sensiscript Rts 2001; issue(2): 13-16.
13. Blaschke V, Reich K, Blaschke S. Quantitative RT-PCR: comparing real-time light cycler technology with quantitative competitive RT-PCR. Biochemica 2002;1:6-7.
14. Nistico A , Young NS. Gamma-interferon gene expression in the bone marrow of patient with aplastic anemia , 1994 Mar: 120: 463-469.
15. Morgan CJ , Hernandez CJ, Ward JS. Detection of cytokine mRNA in vivo by PCR. Transplantation 1993 Aug; 56 (2): 437-443
16. Visser J, Graffelman W, Blauw B, LPS-incubated IL-10 production in whole blood cultures from chronic fatigue syndrome patients is increased but supersensitive to inhibition by dexamethasone. J Neurimmunol 2001 Oct: 119(2):

www.SID.ir

Archive of SID

43-349.
17. Taniguchi A, Kohsaka H, Carson DA. Competitive RT-PCR Elisa: a rapid, sensitive and non-radioactive method to quantitative cytokine mRNA. J Immunol Methods 1994; 169: 101-109.
18. Nigro L, Cacopardo B, Preiser W. In vitro production of type1 and type2 cytokines by peripheral blood mononuclear cell from subjects coinfected with human immunodeficiency virus and leishmania infantum. Am J Trop Med Hyg1999 Jan; 60(1): 142-5.
19. Marshall A, Hodgson J. DNA chips: an array of possibilities. Nat Biotechnol 1998; 16: 27-31.
20. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y. Expression profiling using cDNA microarrays. Nat Genet 1999; 21: 10-14.
21. Kahl KG, Kruse N, Faller H. Expression of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma mRNA in blood cells correlates with depression scores during an acute attack in-patients with multiple sclerosis. Psychneuroendocrinology 2002 Aug; 27(6): 671-81.
22. Pravica V, Perrey C, Stevens A. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-Gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. Hum Immunol 2000 Sep; 61(9): 863-6.

www.SID.ir