Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی شهید صدوقی یزد
سال دهم ، شماره سوم ، پاییز ۱۳۸۱، ص ۳۷

مقایسه مولکولی ژنوم ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV-1) جداشده از بیمار ایرانی با سویه KOS از طریق PCR-RFLP ژن Ul29

محمدمهدی حیدری[۱]، مجید صادقی‌زاده[۲]، مهری خاتمی[۳]، محمدرضا نوری دلویی[٤]

چکیده

ژنوم هرپس ویروس ها از نوع DNA خطی می‌باشد و به عنوان یک مدل مفید برای مطالعه سیستم همانند سازیDNA یوکاریوتی به آن رجوع می شود. نقشه هضم آنزیمی سویه‌های مختلف (HSV1) در کشورهای پیشرفته تعیین شده است. در کشور ما ایران، ویروس های (HSV1) جدا شده از بیماران با استفاده از روش های ایمنولوژیکی تشخیص داده شده است. ولی از نظر ژنتیک مولکولی هنوز مورد بررسی قرار نگرفته‌اند.در این تحقیق با استفاده ازعفونت سلولهای vero توسط ویروس های (HSV1) جدا شده از بیمار ایرانی و پروب ژن UL29 کلون شده در پلاسمید PNN_1 و انجام عمل ساترن بلات اثبات شد که این ایزوله از نوع (HSV1) می باشد. با استفاده از تکثیر ژن UL29 و تعیین پلی‌مورفیسم طولی حاصل از هضم این قطعه با پنج آنزیم برشگر محدودکننده(RCR-RFLP) نشان داده شد که الگوی هضم آنزیمی ویروس (HSV1)جدا شده از بیمار ایرانی با سویه KOS یکسان می‌باشد. بنابر این می توان این روش را جهت مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی جمعیت های مختلف ایرانی استفاده نمود تا اطلاعاتی مربوط به مخزن ژنی سویه های مختلف این ویروس در کشور بدست آید.

واژه های کلیدی: ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ (HSV1) ، ژنUL29 ، PCR-RFLP .

مقدمه

کلمه هرپس «حداقل از ۲۵ قرن پیش در لغت نامه‌های پزشکی وجود داشته است و در زبان یونانی معنی» خزیدن و احساس مورمور کردن می‌دهد[(1)]. در سال ۱۹۸۱، Davison و Wilke نقشه هضم آنزیمی ژنوم HSV1 , HSV2 را با آنزیمهای BamHI, KpnI, BglII, EcoRI, HindIII, XbaI مورد مطالعه قرار دادند و از این طریق پلی مورفیسم قطعات ایجاد شده در دو ویروس را مقایسه نمودند. در سال ۱۹۹۰، Rowley و همکارانش با استفاده از PCR نمودن نمونه مایع CSF جدا شده از چهار بیمار با آنسفالی HSV بهبود یافته وجود HSV را مشخص کردند. اخیراً کارهای زیادی در زمینه تشخیص بالینی HSV در آزمایشگاههای تشخیص طبی با استفاده از PCR نمونه‌های جدا شده از بیماران در حال انجام است. بر اساس خصوصیات بیولوژیکی ، هرپس ویروسها را به سه زیر خانواده تقسیم می کنند : زیر خانواده آلفاهرپس ویروسها ، ویروس هرپس سمپلکس۱و۲ و ویروس واریسلا – زوستر از اعضای این گروه هستند.

۱- عضو هیأت علمی گروه ژنتیک مولکولی - دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد
۲- استادیار گر وه ژنتیک مولکولی پزشکی
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه ژنتیک مولکولی
۲و۳- دانشکده علوم پایه ، دانشگاه تربیت مدرس تهران
٤- استادیار گر وه ژنتیک مولکولی پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی – درمانی تهران

www.SID.ir

Archive of SID

عفونت اولیه بیماری (HSV) معمولا شامل ژانژیواستوماتیس ،عفونت جدی لثه ها،زبان،لبها،ناحیه صورت و حلق که در اوایل کودکی(۱ تا ۲ سالگی) دیده می شود و اغلب با تب شدید،ورم لثه ها،ناتوانی در غذا خوردن همراه است. (HSV) باز فعال شده سبب زخمهای مخاطی می شود که به صورت وزیکولهای کوچک حداقل ٤ تا ۷ روز پس از ابتلا نمایان می شوند. زیر خانواده بتا هرپس ویروسها که سیتومگالوویروس در این گروه طبقه‌بندی می‌شوند. گاما هرپس ویروسها که ویروس اپشتاین ، بار جزء این گروه است [٤،۳] . شبیه دیگر هرپس ویروسها، DNAی HSV خطی و دو رشته‌ای می‌باشد. انتهاهای ژنوم احتمالاً نزدیک هم بوده و پس از ورود به هسته سلول عفونی شده به سرعت حلقوی می‌شود.ژنوم HSV تقریباً شامل ۱۵۰ کیلو جفت باز بوده و درصد G+C در HSV (٦۸٪) می‌باشد[۵]. ژنهای ویروس براساس زمان و احتیاج ویروس به سه گروه تقسیم می‌شوند: ژنهای زودرس، ژنهای اولیه، ژنهای تأخیری. برای شروع عفونت، ویروس باید به گیرنده های سلولی متصل شود. ترکیب شدن پوشش ویروس با غشاء پلاسمایی اتصال ویروس را تسهیل می کند. نسخه‌برداری ، همانندسازی DNAی ویروس و تجمع کپسیدها در هسته اتفاق می‌افتد [٦] . برای شناسایی مولکولی ایزوله های مختلف HSV معمولا از آنزیمهای برش دهنده استفاده می گردد تا تیپ و سوش مخصوص مناطق مختلف شناسایی گردد. چندین سوش مختلف HSV مانندKOS و A44 وغیره در جهان وجود دارد که بعنوان سوش استاندارد HSV شناسایی گردیده و در مناطق مختلف با روشهای مولکولی ایزوله های خود را با این سوشها مقایسه می نمایند و البته منشا مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی نیز می باشد که در این صورت تعداد ایزوله ها افزایش پیدا می کند تا درصد نهایی سوش منطقه مشخص گردد ولی اخیراً دانشمندان اساس مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی خود را بر مبنای ژنهای HSV که درصد موتاسیون آنها بیشتر است بنا نهاده اند[۷] .از آن جمله ژن تایمیدین کیناز(TK) ویروس HSV می باشد که درصد موتاسیون های آن تقریباً با کل ژنوم ویروس نسبت یکسانی داشته است.ژن UL29 ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ کد کننده پروتئین متصل شونده به DNAی تک رشته‌ای (ICP8) می‌باشد. این پروتئین شامل ۱۱۹٦ اسید آمینه می‌باشد[۹،۸] . PCR یک تست نسبتا ساده و بی نهایت حساس است که به سرعت در روش کارهای استاندارد تشخیص HSV پذیرفته شده است. معمولاً پرایمرهای(آغازگرها)کاربردی برای تشخیص HSV برای توالهای مختلفی از ژنهای DNA پلیمراز،UL42 , gB , gD , TK طراحی می شوند. حساسیت تشخیصی اغلب ، از ۱۰ نسخه DNAی ویروس تا ۱۰۰۰ نسخه متغیر است. هضم محصول PCR برای تعیین نوع HSV قابل استفاده است [۱۰،۳] .

روش بررسی

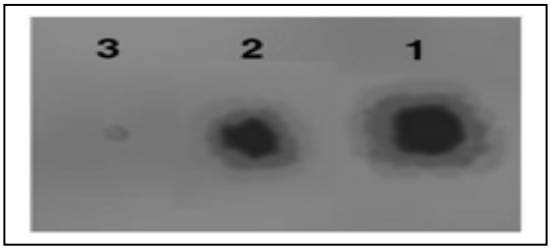
برای کشت ویروس (HSV) جدا شده از بیمار ایرانی (نوع لبی) از یاخته های Vero، استفاده شد. استخراج ژنوم ویروس با رسوب توسط پلی اتیلن گلیکول(٦۰۰۰)۸٪ و روش فنل- کلروفرم انجام گرفت. برای اثبات DNAی ویروس با استفاده از پروب غیررادیواکتیو تهیه شده از ژن UL29 آزمایشهای DNA Dot Blot وSouthern Blot انجام گرفت [۱۱]. پرایمرهای ژن UL29 توسط نرم‌افزار DNAsis طراحی شده و سپس در نرم‌افزارهای Generunner و Vector NTI چک شده تا ایجاد لوپ یا دایمر ننماید. ترتیب بازی و مشخصات پرایمرها به شکل زیر می‌باشد: توالی پرایمر۱ : 5’-AGAGGAATCACGGCCCGCCC-3’ وتوالی پرایمر ۲: 5’- CCCCTTGACCGACGCCGCC -3’.برنامه دستگاه ترمو سیکلر جهت یک دور PCR شامل: ۱- درجه حرارت ۹٤ درجه سانتیگراد بمدت یک دقیقه جهت جدا شدنزنجیره های DNA از هم ۲- درجه حرارت ٦٦/۵ درجه سانتیگراد بمدت یک دقیقه جهت چسبیدن آغازگرها به زنجیره های تک رشته ای DNA ۳- درجه حرارت ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه جهت گسترش زنجیره جدیدDNA . این برنامه برای هر تست PCR ۳۰ بار تکرار می گردد. لازم به ذکر است که در هر سری PCR یک نمونه کنترل مثبت و یک نمونه کنترل منفی نیز گذاشته می شد تا جلو خطاهای احتمالی گرفته شود.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

وقتی تراکم سلولهای Vero به ۹۵٪ رسید بهترین زمان برای عفونی کردن آنها با ویروس HSV-1 می‌باشد برای تست کردن DNAی استخراج شده که مربوط به ویروس HSV-1 است قبل از عمل ساترن بلات، دات بلات DNA انجام گردید. در این حالت از پروب ژن UL29 استفاده شد. بعد از آشکارسازی، نتیجهٔ عمل به صورت لکه‌هایی ظاهر که شدت رنگ آن به غلظت DNA استخراج شده بستگی دارد (شکل ۱). برای اطمینان از خلوص DNA و چک کردن وجود یک باند DNA، مقداری از DNAی استخراج شده رابر روی ژل آگاروز الکتروفورز شد و سپس برای اثبات اینکه باند حاصل مربوط به ویروس HSV-1 جدا شده از بیمار ایرانی است

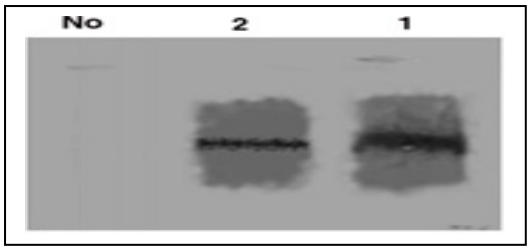


شکل ۱. نتیجهٔ حاصل از DNA Dot Blot
۱- DNA استخراج شده از ویروس HSV-1 جدا شده از بیمار ایرانی
۲ -DNA استخراج شده از ویروس HSV-1 سوی KOS
۳- DNA سلولی (کنترل منفی)

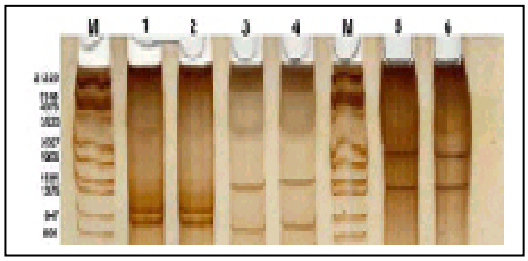
شکل۳. بررسی محصول PCR روی ژل پلی‌آکریل‌آمید
۱- کنترل منفی
۲- کنترل منفی
۳- پلاسمید PNN_1
٤- ویروس HSV-1 سویهٔ KOS
M- مارکر DNA (لامدا ا هضم شده با Hind III)
٥-ویروس HSV-1 جداشده از بیماران ایرانی
٦- پلاسمید PNN_1
۷- کنترل منفی

به کاغذ نیترو سلولز انتقال گردید و از پروب ژن UL29 استفاده شد. پس از آشکارسازی این نتیجه حاصل شد که این DNA مربوط به ویروس HSV-1 است (شکل۲).

پس از تعیین شرایط بهینه PCR، نمونه‌ها PCR شدند. اندازه DNAیی که توسط پرایمرها تکثیر می‌شوند تقریباً ۳۸۰۰bp می‌باشد (شکل۳). محصول PCR با آنزیم برشگر محدودکننده و تحت شرایط بهینهٔ هر آنزیم بطور جداگانه هضم شدند. آنزیمهای استفاده شده در این تحقیق عبارتند از : PstI, DpnI, HinfI, EcoRI, XhoI الگوی هضم آنزیمی این پنج آنزیم در ویروس HSV-1 جدا شده از بیمار ایرانی و سویهٔ KOS هیچ‌گونه تغییری را نشان ندادند (شکلهای ٤-٥-٦).



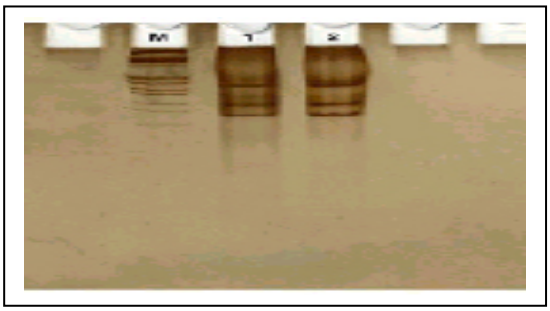
شکل ۲. نتیجه ساترن بلات
۱- DNA استخراج شده از ویروس HSV-1 جدا شده از بیمار ایرانی
۲ - DNA استخراج شده از ویروس HSV-1 سویهٔ KOS
۳- DNA سلولی



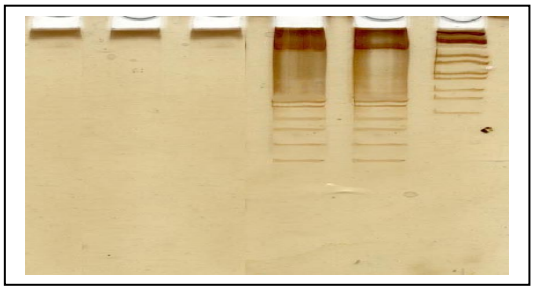
شکل٤. الگوی هضم آنزیم EcoRI ، HinfI و PstI M- مارکر
۱-HSV-1 جدا شده از بیماران ایرانی مربوط به EcoRI
۲- HSV-1 سویهٔ KOS مربوط به EcoRI
۳ - HSV-1 جدا شده از بیماران ایرانی مربوط به HinfI
٤- HSV-1 سویهٔ KOS مربوط به HinfI
٥- HSV-1 جدا شده از بیماران ایرانی مربوط به Pst1
٦ - HSV-1 سویهٔ KOS مربوط به Pst1

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٥.. الگوی هضم آنزیم XhoI M – مارکر
۱- HSV-1 جداشده از بیمار ایرانی
۲- HSV- 1 سویهٔ KOS



شکل٦. الگوی هضم آنزیم DpnI M – مارکر
۱- HSV-1 جدا شده از بیمار ایرانی
۲- HSV-1 سویهٔKSO

بحث

PCR روشی است با حساسیت و ویژگی بالا که در تشخیص بسیاری از بیماری ها از جمله بیماری های عفونی مانند ویروسها، باکتریها و انگلها مورد استفاده قرار می گیرد. بدیهی است که توانمندی آنالیزهای ژنتیک مولکولی از آنالیزهای سرولوژیک بیشتر است. در یک آزمایش که PCR را مستقیماً با کشت ویروس HSV و تشخیص آنتی ژنی ویروس HSV توسط EIA بررسی نمودند اطلاعات نشان داد کهPCR حساستر از کشت ویروس وتشخیص آنتی ژنی است [۱۲].

در مطالعات پیشین نشان داده شده که موتاسیونهای ژن TK بامقاومت دارویی به داروی ضد ویروسی اسیکلوویر همراه است. تکثیر یک قطعه از توالی که پلی مورفیسم ها و موتانسیونهای نوع خاص را درHSV تعیین می کند می تواند برای پیشگویی مقاومت به دارو نیز مورد استفاده قرار گیرد[۱۳].

در این مطالعه با استفاده از کیت Dig DNA Labeling پروب غیررادیواکتیوی از ژن UL29 تهیه شد و برای تست DNAی استخراج شده ویروس HSV جدا شده از بیمار ایرانی که در آزمایشگاه گروه ویروس شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تخلیس شده بود استفاده شد. ایجاد لکه‌های تیره بر روی کاغذ نیتروسلولز در آزمایشهای DNA Dot Blot و Southern Blot نشان دهندهٔ مثبت بودن جواب تست بود. این آزمایش تأیید نمود که ویروس خالص شده از طریق روشهای ایمونولوژیکی، HSV می‌باشند. در این تحقیق پس از اثبات مولکولی ویروس HSV، تنوع ژنتیکی ژن UL29 با استفاده از تکنیک PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت.طول قطعه‌ای که PCR گردید تقریباً حدود ۳۸۰۰bp می‌باشد. سپس این قطعه تکثیر یافته توسط آنزیمهای برشگر محدودکنندهٔ PstI, EcoRI, XhoI, DpnI, HinfI,به طور جداگانه هضم شد و الگوی باندهای ایجاد شده بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۸٪ مورد بررسی قرار گرفت. یکسان بودن الگوی هضم آنزیمی ویروس HSV جداشده از بیمار ایرانی و سویهٔ KOS دلیل دیگری برای تأیید ویروس HSV است و احتمالاً سویه ایرانی نیز از نوع سویه KOS است. البته به علت کم بودن تعداد ایزوله های ایرانی قطعه تکثیر یافته تعیین توالی نشد.

در واقع هدف از این مطالعه شناسایی ایزوله های ایرانی با روش مولکولی نسبت به سوش استاندارد KOS بود که اولین سوال را پاسخ می دهد که ایزوله ایرانی ویروس HSV می باشد ولیکن اگر مطالعه مولکولی اپیدمیولوژی در نظر باشد بایستی تعداد نمونه بیشتری بکار برده شود.همچنین با این آزمایش نشان داده شد که ویروسهای ایزوله شده حتماً HSV هستند و HSV2 ویاVZV نمی باشند زیرا در آزمایشات سرولوژی امکان اشتباه وجود دارد.

بنابر این گروههای ویروس شناسی بهتر می توانند این ویروسها را جداسازی کنند تا مطالعات اپیدمیولوژی انجام دهند . همچنان که بعد از ما گروه ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس از این روش برای تعداد نمونه بیشتری از ایزوله ها استفاده کردند. از این روش می توان به عنوان یک تست تشخیصی نیز در

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایشگاههای تشخیص طبی استفاده کرد. از طرفی با مقایسه آن با ایزوله های HSV2 بیماران ایرانی بتوان یک الگوی افتراقی جهت تعیین سویه های HSV ایرانی بکار برد. استفاده از آنالیزهای آنزیم برشگر محدودکننده وسیلهٔ نیرومندی برای مطالعات اپیدمیولوژیکی می‌باشد.

مطالعه اختلافات و دسته‌بندی سویه‌ها وبررسی تکاملی ویروسها، روش انتقال وپراکنش آنها را تسهیل می کند. جدایی جغرافیایی در ویروسهایی که برای انتقال نیاز به تماس بین افراد دارند (مانند هرپس ویروسها)باعث ایجاد ژنوتیپ های جدید می شود. این روش امکان بررسی اپیدمیولوژی ملکولی جمعیتهای مختلف ایرانی را فراهم می‌آورد تا اطلاعات مربوط به مخزن ژنی سویه‌های مختلف این ویروس در کشور بدست آید.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- **Steven, S., Hodinka, R.L., Yong, S.A.** *Clinical Virology* **Manual.3rd Edition: ASM Press, 2000 : 384-404.**

2- Rowley, A.H., Whitley, R.J., Lakeman, F.D. and Wolinsky, S.M. ***Rapid detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis.*** Lancet , 1990; 335: 440-451.

3- Fields. B.N. Fields. Virology. 1996, 3rd edition. U.S.A: Lippincott Raven Publishers:2525-2541.

4- **Belsh. R.B : Text Book of Human Virology. 2rd edition, U.S.A: Mosby yearbook Inc ,19991: 842-861.**

5- **Boehmer, P.E. and Lehman, I.R.** *Herpes Simplex Virus DNA Replication.* **Annu. Rev. Biochem, 1997, 66: 347- 384.**

6- **Granoff. A. and Webster R.** *Encyclopedia of virology.* **2nd edition. Academic Press, 1999: 1872-1884.**

7- **Nagamine. M. Suzutami. T. et al.** *Comparison of polymorphism of Thimidine Kinase gene and restriction fragment length polymorphism of genomic DNA in Herpes Simplex Virus type 1.* **Journal of Clinical Microbiology , 2000, 38(7): 2750-2760.**

8- **White. D. and Fenner. F.G :** *Medical Virology.* **3rd edition, U.S.A: Academic Press, 1994 : 30-334.**

9- **Weir. J.P :** *Regulation of herpes simplex virus gene expression.* **Gene , 2001, 271: 117- 130.**

10- **Vogel . J.U. Weber . B. and Doerr . H.W.** *Typing and strain differentatin of clinical herpes simplex virus type 1 and 2 isolates by polymerase chain reaction and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis.* **Zentralbl Bakteriol. 1994, 281: 4502- 4512.**

11- **DIG DNA Labeling Detection Kit catalogue, Cat , No. 1093657.Boehringer Mannheim, Germany.**

12- **Slomka. M. J. Emery. P. E. Munday. M. Moulsdale and Brown. D.W.** *A comparison of PCR with virus isolation and direct antigen detection for diagnosis and typing of genital herpes.* **J. Med. Virol. 1986 , 55:177-183.**

13- **Cone . D. M.** Acyclovir-resistant, pathogenic herpesvirus . **Trends Microbiol.1994, 2:481-484.**

www.SID.ir