

تهیه نقشه ژنتیکی ناحیه حفاظت شده 5'UTR (Untranslated Region)

ژنوم ویروس هپاتیت C

نام و نام خانوادگی: یلدا جاوید
امداد راضی: آتای شاهین نوری
رشته: زیست‌شناسی

خلاصه :

در حال حاضر طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی ۱۸۰ میلیون نفر، معادل ۳٪ جمعیت دنیا مبتلا به ویروس هپاتیت C می باشند. از این تعداد ۱۳۰ میلیون نفر ناقل ویروس هستند که در معرض خطر ابتلا به سیروز و سرطان کبد قرار دارند. لذا تشخیص ویروس و تعیین تیترو ژنوتایپ آن برای انتخاب نوع درمان و تصمیم‌گیری‌های بعدی پزشک الزامی می باشد. امروزه در کشورهای در حال توسعه به دلیل عدم دسترسی به تست‌های کمی و کیفی دقیق، سریع و مقرون به صرفه تعیین تیترو HCV و ژنوتایپ آن در سه مرحله مجزا انجام می شود. در این پایان نامه تحقیقاتی نقشه ژنتیکی ناحیه حفاظت شده 5'UTR ویروس هپاتیت C تهیه شده است که می‌تواند مبنای طراحی آزمایش‌های مولکولار قرار گیرد. به عنوان مثال، بر اساس تکنولوژی Real-Time RT-PCR امکان انجام همزمان آزمایش‌های کمی، کیفی و تایپینگ HCV فراهم می شود.

۲۰۹ توالی از ناحیه 5'UTR ژنوم ویروس از بانک‌های اطلاعاتی مربوطه جمع‌آوری و همتراز شدند. سپس یک توالی واحد بر اساس چند ریختی تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism (SNP)) از هر ساب تایپ تهیه شد. در نهایت یک نقشه واحد ژنتیکی از ناحیه 5'UTR تنظیم گردید. این نقشه ژنتیکی نماینده کلیه توالی‌های این ناحیه می باشد که می‌تواند مبنای طراحی پروب هیدرولیز جهت تشخیص و تعیین تیترو ویروس هپاتیت C و پروب‌های هیبریدی‌اسیون برای تعیین ژنوتایپ ویروس قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

از آن اولین صبح پاییزی مهر ماه که دختری غرق در شادی با هدفی والا و قدم‌هایی استوار پای در راه کسب علم و دانش گذاشت سالیان متمادی گذشته است. او با معصومیت کودکانه اش تصمیم گرفت پزشک شود و همیشه جواب انشای "می‌خواهید در آینده چکاره شوید" معلوم بود. چرخه زندگی با خوشی‌ها و ناخوشی‌هایش به سرعت سپری شد و در همه حال دو مونس مهربان با واژه مقدس پدر و مادر در کنار او بوده و عاشقانه حمایتش کردند تا رشد کند و ترقی نماید. خواهری دلسوز یار دیرینش بود و دوست صمیمی اش.

آرزوی دیرین به کام شیرین تحصیل در رشته نوپای زیست‌شناسی بدل شد! استاد ازل نقشی دیگر در سرنوشت او خلق کرد که تلاش و پشتکار فراوان و صبر و خوداتکایی لازمه ادامه راه بود.

پیشکسوتانی بی‌ادعا در جایگاه استاد همراه او شدند که با یاری آنها توشه اندوخته‌تر شد و گنجینه علم ملموس‌تر. حال این پروژه تحقیقاتی ثمره راه تحصیل آکادمیک در مقطع لیسانس و ادامه مسیر زندگی با هدف خدمت و عبودیت است.

خدمات استاد محترم آقای دکتر نعیم خاضعی هرگز فراموش نخواهد شد و حمایت‌های بی‌شائبه استاد عزیز آقای شاهین نگاری، ایده‌های بکر و دیدگاه متعالیشان همواره در ذهن نقشی زرین و ماندگار دارد.

فهرست موضوعات

۲	خلاصه پایان نامه
۳	تشکر و قدردانی
۴	فهرست موضوعات
۶	فهرست علامات اختصاری
۷	فهرست شکل ها
۸	فهرست جداول
۹	متن پایان نامه

۱. مقدمه

۱۰	۱-۱ ویروس هپاتیت C (HCV)
۱۱	۲-۱. اهمیت شناسایی ویروس هپاتیت C
۱۱	۳-۱. اپیدمیولوژی ویروس هپاتیت C
۱۲	۴-۱. روش های آزمایشگاهی بررسی کیفی، کمی و تعیین ژنوتایپ هپاتیت C
۱۴	۵-۱. سیستم Real-Time PCR
۱۵	۶-۱. فرضیه
۱۵	۷-۱. Objectives

۲. مواد و روش ها

۱۶	۱-۲. منابع اطلاعات ژنتیکی
----	---------------------------

۲-۲. نرم افزارهای مورد استفاده ----- ۱۶

۳. نتایج

۱-۳. جمع آوری و همترازی توالی تایپ های مختلف HCV ----- ۱۷

۲-۳. تهیه SNP از ژنوم ساب تایپ های یکسان ----- ۱۸

۳-۳. تهیه نقشه ژنتیکی ناحیه ۵'UTR ----- ۱۸

۴. بحث و نتیجه کلی ----- ۲۳

۵. پیوست ها ----- ۶۳-۱

۶. منابع ----- ۳۱

UTR: Untranslated Region

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

PCR: Polymerase Chain Reaction

HCV: Hepatitis C Virus

EI: Enzyme Immunoassay

RIBA: Recombinant Immunoblotting Assay

فهرست شکل ها

- شکل ۱: ساختار شماتیک ویروس هپاتیت C و ژنوم خطی-----۲۴
- شکل ۲: سیکل تکثیر ویروس درون هپاتوسیت-----۲۵
- شکل ۳: گسترش جهانی ژنوتایپ های HCV-----۲۶
- شکل ۴: پروب هیدرولیز-----۲۷
- شکل ۵: پدیده FRET و پروب های هیبریدیزاسیون-----۲۸
- شکل ۶: مراحل واکنش در PCR-----۲۹
- شکل ۷: نقشه ژنتیکی SNP ناحیه ۵'UTR از کلیه تایپ ها-----۳۰
- شکل ۸: نقشه SNP ناحیه 5'UTR سروتایپ ۱a-----۳۰

فهرست جداول

جدول ۱: نوع و تعداد ژنوتایپ های دانلود شده	۱۸
جدول ۲: حروف نشانه برای نوکلئوتیدهای مشترک در SNP	۱۸
جدول ۳: تایپ های تک ایزوله ای	۱۸
جدول ۴: ثبت نوع نوکلئوتید همه ژنوتایپ ها از شماره ۱ تا ۳۳۰	۱۹
جدول ۵: SNP تایپ 1a	۳۳ پیوست
جدول ۶: SNP تایپ 1b	۳۶ پیوست
جدول ۷: SNP تایپ 1c	۳۸ پیوست
جدول ۸: SNP تایپ 2a	۳۹ پیوست
جدول ۹: SNP تایپ 2b	۴۰ پیوست
جدول ۱۰: SNP تایپ 2e	۴۱ پیوست
جدول ۱۱: SNP تایپ 2f	۴۲ پیوست
جدول ۱۲: SNP تایپ 3a	۴۳ پیوست
جدول ۱۳: SNP تایپ 3b	۴۶ پیوست
جدول ۱۴: SNP تایپ 3k	۴۷ پیوست
جدول ۱۵: SNP تایپ 4a	۴۸ پیوست
جدول ۱۶: SNP تایپ 5a	۴۹ پیوست
جدول ۱۷: SNP تایپ 6a	۴۹ پیوست
جدول ۱۸: SNP تایپ 6c	۵۰ پیوست
جدول ۱۹: SNP تایپ 6e	۵۱ پیوست
جدول ۲۰: SNP تایپ 6f	۵۲ پیوست

جدول ۲۱ : SNP تایپ 6g	۵۳ پیوست
جدول ۲۲ : SNP تایپ 6h	۵۳ پیوست
جدول ۲۳ : SNP تایپ 6i	۵۴ پیوست
جدول ۲۴ : SNP تایپ 6j	۵۵ پیوست
جدول ۲۵ : SNP تایپ 6k	۵۵ پیوست
جدول ۲۶ : SNP تایپ 6l	۵۶ پیوست
جدول ۲۷ : SNP تایپ 6m	۵۷ پیوست
جدول ۲۸ : SNP تایپ 6n	۵۷ پیوست
جدول ۲۹ : SNP تایپ 6q	۵۹ پیوست
جدول ۳۰ : SNP تایپ 6t	۵۹ پیوست

۱-۱. ویروس هپاتیت C (HCV):

برای اولین بار در اوایل سال ۱۹۷۰ با انجام تست بر روی خون های اهدایی برای شناسایی ویروس هپاتیت B ، عامل ویروسی دیگری با عنوان هپاتیت non-A، non-B مطرح شد و به عنوان مهم ترین عامل هپاتیت پس از انتقال خون مورد شناسایی قرار گرفت. تا اینکه در اواخر دهه ۱۹۸۰ دانشمندان موفق شدند ویروس جدید را کلون نموده و بررسی نمایند (۸). حجم بسیار بالایی از سرم شامپانزه مبتلا با تیترا بالای عفونت را تهیه کرده و سانتریفوژ نمودند و اسیدهای نوکلئیک آن را جدا کرده و از روی RNA بدست آمده cDNA را تهیه کردند. بر مبنای cDNA تهیه شده پلی پپتیدهای آن را ساخته و با پروتئین موجود در سرم بیماران به هپاتیت non-A، non-B مقایسه کردند که حاصل آن شناخت ژنوم HCV بود (۴).

ویروس هپاتیت C بسیار کوچک و کروی بوده و در حدود ۵۰ نانومتر می باشد که دارای غشا لیپیدی است که از غشا سلول های میزبان کسب کرده است. HCV تنها عضو گروه Hepaciviridae است که در خانواده Flaviviridae قرار دارد (۳۹، ۴۲). مطالعه خصوصیات ژنوم ویروس و ساختمان و عملکرد محصولات ژنوم منجر به شناسایی بهتر چرخه زندگی ویروس و پاتوژنز بیماری های مربوط به HCV می شود. ژنوم آن RNA مثبت تک رشته ای و دارای پوشش (Envelope) است (۱، ۴۲). کل ژنوم محتوی ۹۶۴۹ نوکلئوتید می باشد (۲۰) که ۱۰ پروتئین متفاوت را کد می نماید (۷) (شکل ۱). ژنوم خطی ویروس در دو انتهای خود دارای دو ناحیه (Untranslated Region) 5' UTR، 3' UTR می باشد که در تنظیم تکثیر RNA ویروسی نقش دارند ولی به پروتئین ترجمه نمی شود. . انتهای 3' دارای ۵۵-۲۷ نوکلئوتید بوده و فاقد توالی poly A می باشد. ناحیه 5' UTR حدوداً ۳۴۰ نوکلئوتید دارد و دارای پوشش متیله می باشد. بخش میانی ژنوم در ابتدا پلی پروتئینی محتوی ۳۰۱۱ آمینواسید تولید می کند. سپس در طی مراحل پروتئین سازی ، این پلی پروتئین به دو گروه پروتئین های ساختمانی و پروتئین های غیر ساختمانی تبدیل می شود. پروتئین های ساختمانی شامل پروتئین مرکزی (Core) با وزن ۲۱-۱۶ KDa ، پروتئین پوششی یک (E1) با وزن ۳۷-۳۱ KDa و پروتئین پوششی دو (E2) با وزن ۷۲-۶۱ KDa می باشد (۲۳). پروتئین های غیر ساختمانی ویروس شامل NS2 با وزن ۲۳ KDa ، NS3 با وزن ۷۰ KDa ، NS4A با وزن ۸ KDa ، NS4B با وزن ۲۷ KDa ، NS5A با وزن ۵۸ KDa و NS5B با وزن ۶۸ KDa است (۲۳). براساس تحقیقات انجام شده ناحیه کدکننده پروتئین های پوشش تغییرپذیرترین (۱۷) و از طرفی ناحیه 5' UTR ثابت ترین توالی را در بین انواع

ژنوتایپ‌های ویروس هپاتیت C دارند (۱۴). بنابراین در تست های ژنوتایپینگ که بر اساس توالی اسید نوکلئیک (Nucleic acid-based) طراحی می شوند امپلیکون (Amplicon) در این ناحیه انتخاب می شود. مراحل همانند سازی ویروس بسیار سریع روی می دهد و در طول یک روز در حدود یک ترلیون نسخه در فرد آلوده تولید می گردد. ویروس، داخل هپاتوسیت های کبد تکثیر می شود. شایان ذکر است که شواهد بحث پرانگیزی در مورد تکثیر درون لنفوسیت ها و یا مونوسیت ها هم وجود دارد. ویروس به گیرنده های هپاتوسیت ها متصل شده و داخل سلول می گردد. دوگیرنده شناخته شده شامل CD81 و SR-BI می باشند. فرایند همانندسازی و نسخه برداری از ژنوم درون هپاتوسیت ها صورت می گیرد.

از چرخه تکثیر ویروس اطلاعات اندکی در دسترس می باشد زیرا هنوز سیستمی برای کشت در محیط آزمایشگاهی ایجاد نشده است (۳۳). البته تحقیقات گسترده ای در این زمینه در حال انجام است (۱۸). مدل ریاضی نیمه عمر ویروس را در خون تقریباً ۲.۵ ساعت، زمان تقسیم ویروس را ۱۷.۷ ساعت و میزان تولید ویروس در یک بیمار مبتلا به عفونت مزمن را 10^{12} ویروئید در روز برآورد کرده اند (۴۰).

۲-۱. اهمیت شناسایی ویروس هپاتیت C

عفونت با HCV به عنوان یک مشکل جهانی مطرح می شود. طبق آمارهای سازمان بهداشت جهانی، در حدود ۱۸۰ میلیون نفر در سراسر دنیا به هپاتیت C مبتلا می باشند که از این تعداد ۱۳۰ میلیون نفر آنها ناقل ویروس هستند که در معرض خطر ابتلا به سیروز و سرطان کبد قرار دارند (۳۷). سالانه ۳ تا ۴ میلیون نفر به تعداد مبتلایان به ویروس اضافه می گردد. متأسفانه بین ۷۰-۹۰ درصد موارد، آلودگی به HCV منجر به بروز بیماری به صورت مزمن می شود و مبتلایان تا سالیان متمادی ناقل ویروس خواهند بود. شایان ذکر است در حدود ۵۰ تا ۷۷ درصد موارد ابتلا به سیروز کبدی و سرطان کبد، ناشی از آلودگی با HCV می باشد

۳-۱. اپیدمیولوژی ویروس هپاتیت C

بعد از کلون کردن اولین cDNA از HCV (۸) و تعیین توالی ایزوله های گوناگون از نقاط مختلف جهان، تفاوت های ژنتیکی قابل توجهی بین ژنوم های HCV ظاهر شد (۱۰). در حدود ۳۳ درصد از کل ژنوم در تایپ های گوناگون با یکدیگر متفاوت است و شباهت توالی ژنوم بین ساب تایپ های متفاوت ۷۵-۸۶ درصد می باشد (۴۵).

براساس تحقیقات انجام شده، ۱۱ (۱-۱۱) تایپ و بیش از ۷۰ ساب تایپ مختلف که با حروف کوچک مشخص می شوند مانند (a,b,c...) از HCV گزارش شده است (۴۵). گسترش جغرافیایی ویروس هپاتیت C آن را به عنوان یک

مشکل جهانی بهداشت و سلامتی مطرح کرده است و شیوع ژنوتایپ ویروس نسبت به منطقه جغرافیایی متغیر می باشد. در آمریکای شمالی، a^۱ شایعترین ژنوتایپ است و پس از آن b^۱ و ۲a و ۲b و ۳a دیده می شوند (۴۶). در اروپا b^۱ رایج ترین نوع است و تایپ های ۲a و ۲b و ۲c و ۳a به ترتیب در درجات بعدی شیوع قرار دارند. تایپ ۳ در کشورهای هند، پاکستان، استرالیا و اسکاتلند شایع است و تایپ ۴ از آفریقا خصوصا کشور مصر (۱۰) گزارش داده شده است و تایپ ۵ محدود به آفریقای جنوبی می باشد. ژنوتایپ ۶ هم در هنگ کنگ بسیار شایع است. انواع ۸، ۷ و ۹ درویتنام متداول می باشند و نمونه های ۱۰ و ۱۱ تنها از اندونزی گزارش شده اند. در مجموع ژنوتایپ های a^۱ و b^۱ شایع ترین تایپ ها در کل نقاط جهان هستند و ۶۰٪ آلودگی ها را شامل می شوند. (۳۰). ژنوتایپ ۲ بعد از تایپ ۱ بیشترین شیوع جهانی را دارد. بر اساس پژوهش های صورت گرفته شایع ترین ژنوتایپ های ایران عبارتند از a^۱ و ۳a^۱ و b^۱ که به ترتیب با میزان شیوع ۴۷٪، ۳۶٪، ۸٪ و ۷٪ می باشند. این آمار نتیجه مطالعه بر روی بیماران با عوامل خطر ساز مانند مصرف کنندگان مواد مخدر تزریقی با سرنگ مشترک و دریافت کنندگان خون و فرآورده های آن و بیماران دیالیزی است (۳۵).

این ویروس از طریق خون، تماس جنسی و نیز از مادر به جنین انتقال می یابد. معتادان تزریقی، افراد دریافت کننده پیوند عضو و بیماران هموفیلی در دسته ریسک بالای عفونت قرار دارند.

۴-۱. روش های آزمایشگاهی بررسی کیفی، کمی و تعیین ژنوتایپ هپاتیت C

آلودگی به HCV علایم بالینی مشخص و متمایزی با سایر عفونت های کبدی ندارد. بنابراین بکارگیری روش های تشخیص آزمایشگاهی لازم و ضروری می باشد. این آزمایش ها شامل تست های کیفی برای تشخیص عفونت، آزمایش های کمی به جهت تعیین تیتراژ آن در نمونه و تعیین ژنوتایپ برای تشخیص ژنوتایپ ویروس هپاتیت C که فرد به آن آلوده شده است، می باشند. علاوه بر تشخیص، نتایج این آزمایش ها در زمینه های دیگری نیز بکار می روند. برای مثال پزشک بر اساس تیتراژ ویروس و ژنوتایپ آن نوع درمان مناسب و مدت زمان لازم برای درمان را تجویز می نماید (۵، ۶، ۲۸، ۳۸). به عنوان مثال برای مبتلایان به آلودگی با ژنوتایپ ۱ دوره درمان طولانی تری تجویز می شود. زیرا این تایپ آسیب های کبدی شدیدتری را نسبت به سایر تایپ ها بوجود می آورد (۲۳) و بدخیمی عفونت هپاتوسیت شایع تر و پاسخ به درمان کم تر است (۳۹). برای نوع عفونت با ژنوتایپ های ۲ و ۳ درمان هم زمان ریباویرین و اینترفرون مناسب است (۳۸). همچنین با توجه به این اطلاعات پزشک می تواند احتمال عود بیماری و بروز بیماری های سخت کبدی از جمله سرطان را پیشبینی نماید و در مورد درمان ثانویه تصمیم گیری کند (۲۶). همچنین با

دانستن نوع ژنوتایپ می توان منبع انتقال ویروس را در یک منطقه جغرافیایی شناسایی نمود (۲۲). لذا با توجه به نقش HCV در بروز سیروز و سرطان کبد ، تشخیص عفونت و تعیین تیتروژنوتایپ ویروس در مراحل ابتدایی بیماری ، بسیار ضروری است (۴۶، ۶).

روش های کیفی برای شناسایی ویروس هپاتیت C شامل روش هایی است که امکان سنجش آنتی بادی علیه ویروس ، آنتی ژن ویروس و یا شناسایی اسید نوکلئیک ویروس را فراهم می کنند. برای تست و شناسایی عفونت در بیماران ، آسانترین و کم هزینه ترین روش، جست و جوی آنتی بادی بر علیه ویروس در خون با استفاده از روش های ایمنو اسی (Enzyme Immunoassay, EI) و کمی لومینسانس (Chemiluminescence) است که از سال ۱۹۸۹ میلادی رایج شده اند. روش آزمایشگاهی EI بر مبنای واکنش آنتی ژن و آنتی بادی بوده و کیت های طراحی شده توانایی شناسایی آنتی بادی کلاس های IgG و IgM را دارند. از جمله معایب این کیت ها می توان به حساسیت کم و نتیجه مثبت یا منفی کاذب و... اشاره کرد. در بیمارانی که مبتلا به عفونت مزمن نمی شوند و بهبود می یابند آنتی بادی تا سال ها پس از عفونت مثبت است. بنابراین فقط با سنجش آنتی بادی امکان تشخیص تمام موارد عفونت مقدور نمی باشد و تمام بیمارانی که در آزمایش های سرولوژیک فوق مثبت هستند نیز الزاما مبتلا به عفونت نبوده و در ۱۵-۲۵٪ آن ها ، ژنوم ویروس قابل شناسایی نیست. به علت وجود موارد مثبت کاذب در روش EI ، تستی به عنوان آزمایش تاییدی (Confirmatory) و یا تکمیلی (Supplementary) بکار برده می شود تا امکان افتراق واکنش های اختصاصی و غیر اختصاصی آنتی بادی بیمار با آنتی ژن موجود در آزمایش فراهم آید این تست بر مبنای روش نقطه گذاری (Blotting) و با کمک آنتی ژن های نوترکیب پایه ریزی شده است که Recombinant Immunoblotting Assay (RIBA) نامیده می شود.

آنتی بادی بر علیه HCV ۱ تا ۳ ماه بعد از آلودگی ظاهر می شود. در حالیکه ژنوم ویروس بعد از ۱ تا ۲ هفته ، قابل شناسایی است. همچنین در حدود ۳۰٪ موارد عفونت توسط تست های سرولوژیک شناسایی نمی شود که موجب کاهش اطمینان به این تست ها می گردد (۹).

در نتیجه تست های سرولوژیکی رایج به دلیل طولانی بودن و ایجاد احتمال نتایج کاذب ، به تنهایی قابل اعتماد نیستند.

امروزه روش های تشخیصی آزمایشگاهی مولکولی و کیت های تجاری متعددی جهت تعیین تیترو ویروس و ژنوتایپ آن طراحی شده اند و در آزمایشگاه های تشخیصی و تحقیقاتی بکار می روند که متداول ترین آن ها برای تعیین ژنوتایپ HCV شامل نمونه های زیر می باشد:

* تعیین توالی اسید نوکلئیک: اگر چه این روش منجر به نتایج معتبری می گردد ولی بسیار گران بوده و تنها برای آزمایشگاه های مجهز و بسیار پیشرفته با حجم بالای نمونه آزمایشگاهی مقرون به صرفه است (۱۲).

* تست Line Probe Assay : این تست در مقایسه با روش فوق ، نیاز به دسترسی به ابزار و تجهیزات پیچیده ندارد ، ولی مستلزم انجام مراحل بسیار می باشد و لذا روشی فوق العاده وقت گیر است (۴۱).

* تست Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (۱۹)

* روش Polymerase Chain Reaction (PCR) (۳۲)

برای تعیین تیترو ویروس هم کیت هایی مانند Amplicor HCV و Quantiplex™ HCV RNA Monitor™ مورد استفاده قرار می گیرند

روش های آزمایشگاهی مولکولار پیشرفت های قابل توجهی را در زمینه تشخیص و شناسایی HCV بوجود آورده اند با اینحال ، تست های کیفی ، کمی و تایپینگ HCV بصورت مجزا انجام می شوند که موجب افزایش احتمال آلودگی و متعاقب آن میزان احتمال خطا می شوند. استفاده از کیت های تشخیصی هم به جهت بالا بودن هزینه ، در کشورهای در حال توسعه متداول نمی باشد.

۱-۵. سیستم Real-Time PCR

در اواسط دهه نود ابداع تکنیک Real-Time PCR تحول بنیادین در روش های تشخیصی مولکولار بوجود آورد. این تکنولوژی مزایای قابل توجهی نسبت به PCR معمولی دارد و مکانیسم آن بر پایه شناسایی رنگ های فلورسانت مانند تکنیک SYBR Green (۳۱) و یا پروب های نشاندار شده مانند پروب هیدرولیز (۱۳) (Taqman) ، پروب هیبریدیزاسیون (۴۴) و یا Molecular Beacons (۴۳) می باشد. تکثیر ماده ژنتیکی به همان روش PCR صورت می گیرد اما برخلاف آن دیگر نیازی به مراحل محلی مانند الکتروفورز و رنگ آمیزی نمی باشد. علاوه بر این، مقدار محصول واکنش در طی هر چرخه بوسیله میزان فلورسانت ساطع شده قابل ثبت و اندازه گیری می باشد. در حالیکه در PCR معمولی تنها امکان بررسی و تشخیص پس از تجمع محصول به میزان لازم در انتهای چند چرخه واکنش وجود دارد (۲، ۳، ۱۵، ۱۶، ۳۶). لذا این تکنیک از حساسیت ، دقت و سرعت بیشتری نسبت به روش های قبلی برخوردار است. این سیستم بر اساس تشخیص و ثبت میزان نور فلورسانت طراحی شده است و با افزایش تدریجی مقدار امپلیکون (Amplicon) میزان سیگنال فلورسانت هم افزایش می یابد و بدین ترتیب امکان تعیین تیترو ویروس در طی واکنش امکان پذیر است. همچنین با استفاده از روش های مختلف می توان ژنوتایپ ویروس را مشخص نمود. امروزه محققین

قادرند به کمک Real-Time PCR آزمایش های کمی و کیفی و تایپینگ HCV را در دو مرحله انجام دهند(۲).
(۳۶).

• پروب های هیدرولیز و هیبریدیزاسیون :

پروب هیدرولیز یک الیگونوکلوئوتید است که حاوی دو رنگ فلورسانت به نام Reporter در انتهای 5' و Quencher در انتهای 3' سیکوانس خود می باشد(۲۵). تا زمانیکه پروب با سیکوانس مکمل هیبرید می باشد ، بر اساس پدیده Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)، این دو رنگ در مجاورت یکدیگر هستند و طول موج ساطع شده از Reporter توسط Quencher جذب می شود. با پیشرفت جریان واکنش ، در فاز PCR Extension ، بر اثر فعالیت Taq-DNA Polymerase، پروب شکسته شده و رنگ ها از یکدیگر جدا شده و FRET از بین می رود. در نتیجه طول موج فلورسانت رپورتر در محیط ساطع می شود و توسط سیستم دریافت می گردد. وجود پروب هیچ تداخلی در فرایند PCR ایجاد نمی نماید و با برداشته شدن پروب ، فعالیت پلیمریزاسیون به کمک پرایمر موجود انجام می شود. افزایش شدت رنگ رپورتر طی هر چرخه با میزان امپلیکون های تولید شده نسبت دارد. یک مزیت استفاده پروب هیدرولیز (Taqman) نسبت به DNA bonding dye این است که باید هیبریدیزاسیون اختصاصی بین پروب و سیکوانس هدف ایجاد شود تا سیگنال فلورسانت ارسال شود در نتیجه امپلیفیکاسیون های غیر اختصاصی که به دلیل mis-priming و یا primer-dimer حاصل شده اند سیگنال تولید نمی کنند. مزیت دیگر آنکه ، پروب ها می توانند بوسیله رنگ های متفاوت و قابل تشخیصی نشاندار شوند. بنابراین با بکارگیری پروب های نشاندار شده با رپورترهای متفاوت همزمان می توانیم امپلیفیکاسیون دو سیکوانس جداگانه را در یک واکنش PCR بررسی نماییم.

پروب دیگر که در سیستم استفاده می شود ، پروب های هیبریدیزاسیون می باشند. در این روش دو پروب به نام های انکور(Anchor) و سنسور (Sensor) طراحی می شود که سبب افزایش توانایی ژنوتایپینگ و حساسیت تست می گردد(۴۴).

پروب انکور در انتهای 3' خود دارای رنگ دهنده (Fluorescein Donor) و پروب سنسور در انتهای 5' ، دارای رنگ گیرنده(Acceptor Fluorophore) می باشد. سنسور در انتهای 3' خود مسدود می شود تا از Extension آن در طی مرحله Annealing جلوگیری شود. در واقع تا زمانیکه پدیده FRET اتفاق نیفتاده است و رنگ ها دور از یکدیگر هستند ، رنگ فلورسانت زمینه مربوط به طول موج منتشره از انکور می باشد. بعد از مرحله Denaturation

، هر دو پروب با سیکوانس مکمل خود هیبرید شده و متعاقباً رنگ های فلورسانس در مجاورت یکدیگر قرار می گیرند. به دلیل فاصله بسیار کوتاه بین مولکول ها ، FRET روی می دهد و تابش حاصل از رنگ فلورسانس دهنده موجب تحریک گیرنده شده و طول موج منتشر شده توسط دستگاه ثبت می شود. افزایش میزان تابش نشاندهنده افزایش مقدار امپلیکون تولید شده می باشد.

با توجه به اینکه انجام پدیده FRET تنها منوط به هیبرید شدن هر دو پروب با توالی مکملشان است ، لذا این روش موجب افزایش دقت و حساسیت در نتیجه تست و همچنین انعطاف بیشتر در طراحی پروب های متنوع تر می گردد. جدایی پروب ها از روی Amplicon موجب کاهش پدیده FRET می شود و می توان با اندازه گیری تابش فلورسانس دمای ذوب (Melting Temperature) پروب را تعیین نمود. این دما ، نقطه ای است که در آن رشته پروب از رشته مکمل خود جدا می شود و پیوندهای هیدروژنی بین نوکلئوتیدی شکسته می شود. از این پارامتر می توان در تشخیص هر گونه mismatch بین دو رشته استفاده نمود. در نتیجه این دما به میزان انطباق و تفاوت پروب با Amplicon بستگی دارد که در تایپ های مختلف ویروس متفاوت است. بنابراین با تعیین دمای ذوب می توان تایپ ویروس را تعیین نمود. این امکان در PCR معمولی وجود ندارد.

• کیت های متداول و مشکلات آن ها :

تولیدکننده های مختلفی کیت های مخصوص Real-Time PCR را برای تشخیص و تعیین ژنوتایپ و تیتراژ HCV تولید و به بازار عرضه کرده اند. کیت های متداول و موجود اختصاصی هستند و با دقت و صحت تست های آزمایشگاهی را انجام می دهند ولی متأسفانه هنوز در دو مرحله مجزا تشخیص ، تعیین تیتراژ و تعیین ژنوتایپ صورت می پذیرد و همچنین بسیار گران بوده و در کشورهای در حال توسعه استفاده متداول و گسترده آنها مقرون به صرفه نمی باشد.

۱-۶. فرضیه

با توجه به اینکه می توان بصورت جداگانه تشخیص و تعیین تیتراژ ویروس (۲۴، ۲۹، ۳۴) و تعیین ژنوتایپ ویروس HCV (۲، ۳۶) را با سیستم Real-Time PCR انجام داد ، لذا پیشنهاد می شود سیستمی طراحی گردد که بر اساس تکنولوژی Real-Time RT-PCR بتواند بطور همزمان آزمایش های کمی ، کیفی و تایپینگ HCV را انجام دهد. برای طراحی چنین سیستمی نقشه ژنتیکی ناحیه 5'UTR می بایست تهیه گردد.

۷-۱. Objectives

- ۱) سیکوانس تمامی ژنوم های گزارش داده شده HCV از بانک های اطلاعاتی جمع آوری گردد.
- ۲) ژنوم ها با یکدیگر منطبق شوند و یک توالی نماینده از هر ساب تایپ تهیه گردد. (SNP از ژنوم ساب تایپ های یکسان تنظیم شود).
- ۳) ناحیه امپلیکون (Amplicon) انتخاب گردد.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. منابع اطلاعات ژنتیکی:

در مجموع ۲۸۹ توالی ژنوم کامل و ۲۰۹ توالی ناحیه 5'UTR ویروس هپاتیت C بصورت فرمت FASTA از دو بانک اطلاعات ژنتیکی زیرگردآوری شد. (۱۱، ۲۷)

1) Entrez gene: (www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/viruses)

2) Los Alamos : (www.hcv.lanl.org)

۲-۲. نرم افزارهای مورد استفاده :

- ۱) ClustalX: این نرم افزار جهت انطباق کلیه توالی های ژنوم کامل و همچنین ناحیه 5'UTR ویروس ، مورد استفاده قرار گرفت. تمامی مراحل مطابق راهنمای برنامه انجام شد (۳۷).

۳. نتایج

۳-۱. جمع آوری و همترازی توالی تایپ های مختلف HCV

۱۰۰ توالی از ناحیه 5'UTR از وب سایت Entrez gene و ۱۸۹ ایزوله متفاوت از سیکوانس کامل ژنوم و ۲۰۹ توالی هم از ناحیه 5'UTR ژنوم از وب سایت Los Alamos بصورت فرمت FASTA جمع آوری گردید. سپس کلیه ۴۹۸ توالی ، بوسیله ClustalX هم ردیف شدند. پس از بررسی و مقایسه نتایج بدست آمده ، ۲۰۹ توالی مربوط به ناحیه 5'UTR بعنوان الگو اصلی کار انتخاب گردید. (پیوست شماره ۱) جمعا ۲۰۹ توالی ناحیه 5'UTR ژنوم HCV در ۳۳ تایپ متفاوت طبقه بندی می شوند. (جدول ۱)

ژنوتایپ	1a	1b	1c	2a	2b	2c	2e	2f	2k	3a	3b
تعداد	23	49	3	16	4	1	4	2	1	26	8
ژنوتایپ	3k	4a	5a	6	6a	6b	6c	6d	6e	6f	6g
تعداد	6	2	3	1	5	3	2	2	5	7	5
ژنوتایپ	6h	6i	6j	6k	6l	6m	6n	6o	6p	6q	6t
تعداد	3	5	3	4	4	4	2	1	1	2	2

جدول ۱: نوع و تعداد ژنو تایپ های دانلود شده

۳-۲. تهیه SNP از ژنوم ساب تایپ های یکسان:

در این مرحله پس از Alignment کلی، نسخه های هر تایپ بصورت جداگانه با یکدیگر ردیف شدند و سپس اطلاعات نوکلئوتیدی بصورت SNP از نوکلئوتید شماره ۱ تا نوکلئوتید شماره ۳۴۰ ناحیه 5' UTR تایپ های ویروس تنظیم شد و در نتیجه ۲۰۹ گروه به ۳۳ گروه تقلیل یافت و برای هر گروه یک الگو مشترک که نماینده همه اعضا گروه باشد، تهیه شد. (پیوست شماره ۲) برای تهیه SNP، نوکلئوتیدها به ترتیب زیر نمایش داده می شوند (جدول ۲)

حرف نشانه	S	Y	M	H	D	N	K	B	V	W	R
نوکلئوتید	G/C	C/T	A/C	A/C/T	A/G/T	A/G/C/T	G/T	C/G/T	A/G/C	A/T	A/G

جدول ۲: حروف نشانه برای نوکلئوتیدهای مشترک در SNP

جدول ۳: تایپ های تک ایزوله ای

حرف نشانه	S	Y	M	H	D
نوکلئوتید	2c	2k	6	6O	6P

سپس ۳۳ توالی SNP شده با ClustalX ردیف

شدند. (برپیت شماره ۴)

۳-۳. تهیه نقشه ژنتیکی ناحیه 5' UTR:

در این مرحله با استفاده از نتایج هم ردیف شدن ۳۳ ژنوتایپ، نوکلئوتیدهای شماره ۱ تا ۳۴۰ همه نسخه ها بررسی شد و نوکلئوتیدهای متفاوت با ذکر شماره و نوع ثبت گردید (جدول ۴). سپس بر اساس این اطلاعات، نقشه SNP ناحیه 5' UTR تنظیم شد. (شکل ۷)

شماره نوکلئوتید	نوکلئوتید رایج	گروه های متفاوت	نوکلئوتید متفاوت
1	G	1a,1b, 2c, 2e, 2f, 2a, 5a, 3k, 4a	A, T
4	A	1b, 2c, 2e, 2k, 2a, 2b, 5a, 3b, 3k, 4a	C, T
5	G	1a	A
7	C	4a	T
8	C	3b, 3k	T
9	C	1a, 4a	T
10	T	1a, 1b, 1c, 2b, 4a	C
11	T	1a, 1b, 2c, 2e, 2k, 2f, 2a, 3b	A, C, G
12	A	1a, 1b, 2a, 2b, 1c, 6g, 3b, 3k	G, T
13	A	1a, 1b, 2f, 2a, 5a, 3b, 3k, 4a	C, T
14	T	6e, 6g, 6c, 6f, 6i, 6l, 6n, 3a	C, G
15	G	2e, 3a	A
16	G	1b, 2c, 2e, 3a	A, C, T
17	G	3k, 4a, 3a	A, C
18	G	3a, 3b	A, T
19	G	4a, 3a	A
20	G	3a	C
21	C	3a	G
22	G	1b, 4a, 3a	A
23	A	3a	C, G
24	C	1a, 3a	G, T
25	A	3a	G
26	C	3a	G
27	T	1b, 3a	C, G
28	C	1a	T
30	A	2c, 2e, 2k, 2f, 2a, 2b, 1c, 6a	G
31	C	1a	G
35	G	1a, 1b, 2b, 6k, 1c, 6n, 6a	A, T
36	A	1a, 1b, 1c, 3a	G
37	A	3b	G
38	T	1a, 1b, 2a, 4a	C
39	C	1a, 1b	T
40	A	1a, 4a	G
41	C	3a	A, G
42	T	1b	C
43	C	1a	A
45	C	6q	T
46	C	6q	T

شماره نوکلئوتید	نوکلئوتید رایج	گروه های متفاوت	نوکلئوتید متفاوت
47	T	1a, 6n	C
48	G	6n	T
49	T	2a	C
50	G	1b	T
55	A	6g	G
57	T	3a	G
58	A	1a, 3b, 3k, 4a, 3a	C, G, T
59	C	1a, 1b, 6q, 6n, 6m	A, T
61	G	6n	T
62	T	6n	C
63	C	6n, 6a, 3a	G, T
67	A	1a	C
70	C	3a	G
71	A	3k, 3a	G
72	G	1a	A
79	T	2f, 2a, 3a	C
82	A	3a	C
83	G	2a	A
86	A	3a	C
93	T	1b	C
95	G	3a	A, C
96	T	3a	C
98	T	3a, 3b, 3k	C
102	T	6q	C
104	T	1b	A
105	C	1b, 6c, 6q, 4a	T
107	T	5a	A
108	G	1a, 1b, 2c, 2e, 2k, 2f, 2a, 2b, 6c, 6l, 6q, 6n, 6m, 6a, 5a, 4a	A
109	C	1b	T
111	G	1b, 6q	A
113	C	3a	A
117	A	1b	G
118	G	6q	A
120	A	2c, 2e, 2k, 2f, 2a, 2b, 2a, 6c, 6a, 6b, 3b, 3k, 3a	C, G, T
121	C	6p, 6k, 6t, 6e, 6g, 6m, 6n	T
122	C	6o, 6k, 6q	T
127	C	1b, 3a	T
129	C	3b	T

شماره نوکلئوتید	نوکلئوتید رایج	گروه های متفاوت	نوکلئوتید متفاوت
133	G	6a	C
137	A	6g	G
138	G	6m	C
141	A	3a	G
143	A	1b	G
145	T	1b	C
146	G	6k, 6b	A
151	G	4a	T
153	G	3a	A
163	A	1a	G
166	A	6p	T
167	C	1b	T
168	A	1a	N
172	G	1b	A
176	T	3k, 4a, 3a	C, G
178	G	2b	A
179	C	3a	T
180	A	1b, 2c, 2e, 2k, 2f, 2a, 2b, 5a, 3k, 4a, 3a	G
182	G	1a, 2b,	A
183	A	3k, 3a	G, T
184	C	1b, 2c, 2e, 2k, 2f, 2a, 2b, 6, 6h, 6k, 6t, 5a, 3k, 4a, 3a	A, T
186	A	1a	T
188	C	1b, 2c, 2e, 2k, 2f, 2a, 2b, 6m, 6n	A, T
192	T	6m	C
196	T	3a	G
197	T	3a	G
198	C	3a	A
199	T	3a	C
202	G	1a	C
203	A	1a, 2a	G
204	T	6, 3b, 3k, 3a	A, G
205			
206	A	3k, 3a	C, T
207	A	1a	C
208	C	1a, 6p, 6c, 6a, 6b	A
211	C	1b	T
212	G	1b, 2c, 2e, 2k, 2f, 2a, 2b, 6n, 6m	A, T
216	A	1a, 1b, 2c, 2e, 2k, 2f, 2a, 2b, 6k, 6m	G, T

شماره نوکلئوتید	نوکلئوتید رایج	گروه های متفاوت	نوکلئوتید متفاوت
217	A	2a, 6f	G
218	T	1c	C
219	G	3a	A
220	C	2b	T
222	T	1b, 2c, 2e, 2k, 2f, 2a, 2b, 5a, 3b, 3k, 4a, 3a	C
223	G	3a	A
225	A	1b, 2c, 2e, 2k, 2f, 2a, 2b, 3a	C, T
226	G	1b, 2c, 2e, 2k, 2a, 2b, 3k, 4a, 3a	A, C
228	T	3a	C
235	G	2b	A
236	T	1a, 2b	C
244	C	3a	G
245	G	1a, 1b, 2c, 2e, 2f, 2k, 2a, 2b, 6h, 6k, 1c, 6a, 6b, 3k, 4a, 3a	C
249	C	6k, 3b, 3a	T
250	T	1b, 2e, 2a, 6f, 3b, 3a	C
251	G	1b, 3b, 3a	A
254	A	1a	G
258	G	2b	T
264	T	1b, 2c, 2e, 2f, 2k, 2a, 2b, 6m, 6a, 6b	C
270	G	1b	T
272	C	1b, 2c, 2e, 2f, 2k, 2a, 2b, 6a, 6b	T
275	G	6k	C
278	A	2b	C
279	G	3a	T
280	G	3a	C
283	T	2f	C
286	T	1a, 6j	C
288	G	3a	C
303	G	1b	T
304	T	1a, 2a	C, G
311	G	6k	A
313	G	1b	A
320	G	1a	A
321	G	3a	T
322	G	3a	T
326	T	2b	C
332	A	6h, 3k	G
333	G	6h, 3k	C
334	A	6t	C
335	C	6h, 3k	A, T
337	G	2a, 3k	A
340	C	3a	T

جدول ۴ : ثبت نوع نوکلئوتید همه ژنوتایپ ها از شماره ۱ تا ۳۳۰

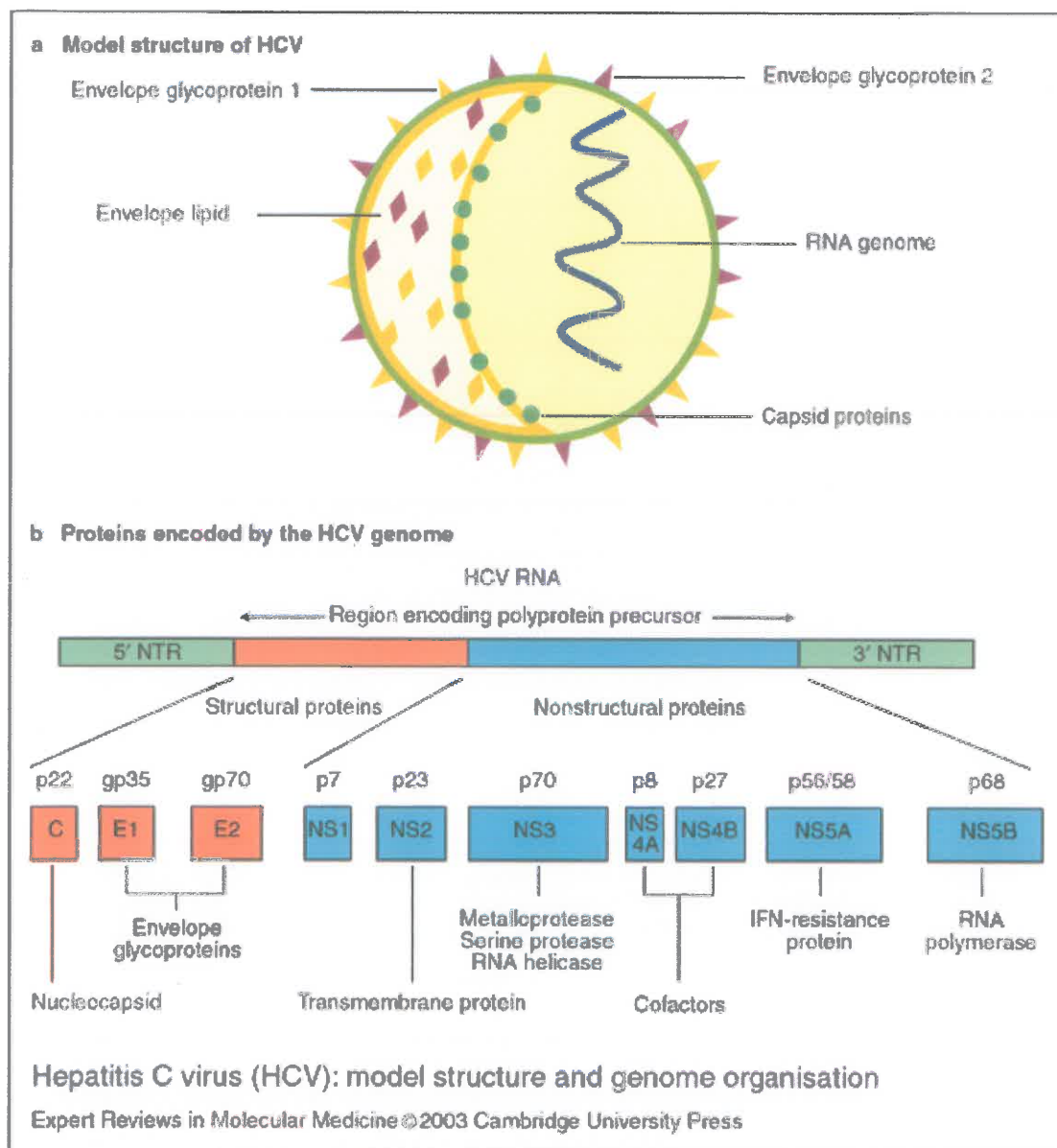
بحث و نتیجه کلی :

مساله مورد بحث در این مقاله علت انتخاب ناحیه 5'UTR می باشد. این ناحیه حفاظت شده ترین قسمت در ژنوم ویروس هپاتیت C است و احتمال تغییرات ژنتیکی در آن بسیار کم می باشد. لذا این مورد موجب افزایش عمر سیستم و قابل اعتماد بودن بیشتر آن می شود.

در این پایان نامه تحقیقاتی ، نقشه ژنتیکی دقیق ناحیه 5'UTR تهیه شده است . که بر اساس آن می توان پروب های هیبریدیژاسیون برای تعیین ژنوتیپ و هیدرولیز برای تشخیص و تعیین تیترو ویروس را طراحی و بطور همزمان استفاده نمود. پیشنهاد می شود بر اساس نتایج بدست آمده و شیوع تایپ 1a، سروتایپ (1a(H77 به عنوان الگو جهت طراحی

انتخاب گردد. (شکل ۸) (سروت ۱a(H77

شکل ها :

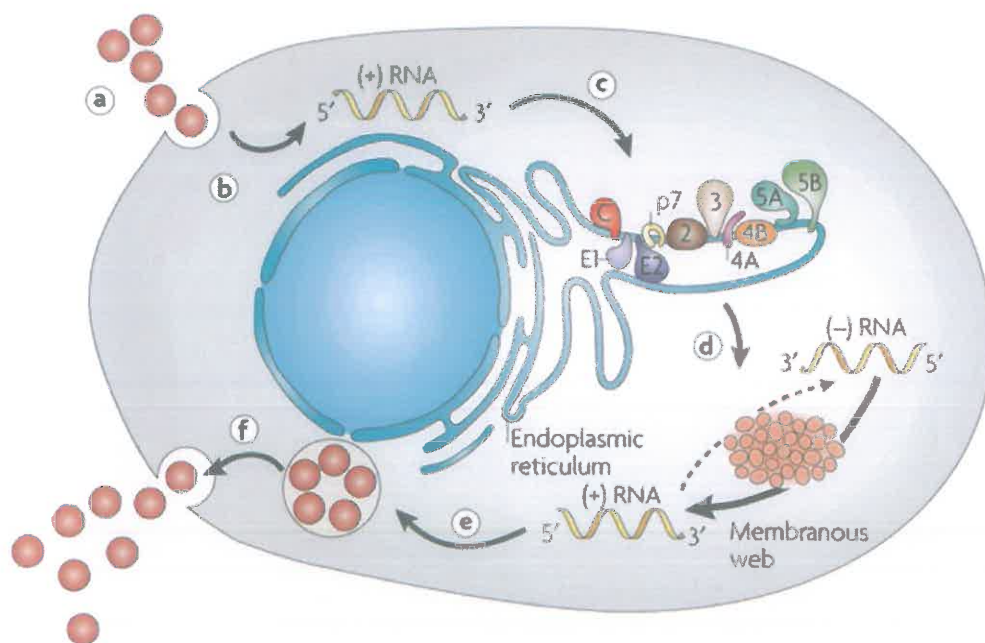


شکل (۱) ویروس هپاتیت C : (a) ساختار شماتیک ویروس

(b) ژنوم خطی ویروس و پروتئین های مربوطه

مرجع: Expert Reviews in Molecular Medicine Vol. 5; 19 November 2003

<http://www.expertreviews.org/>

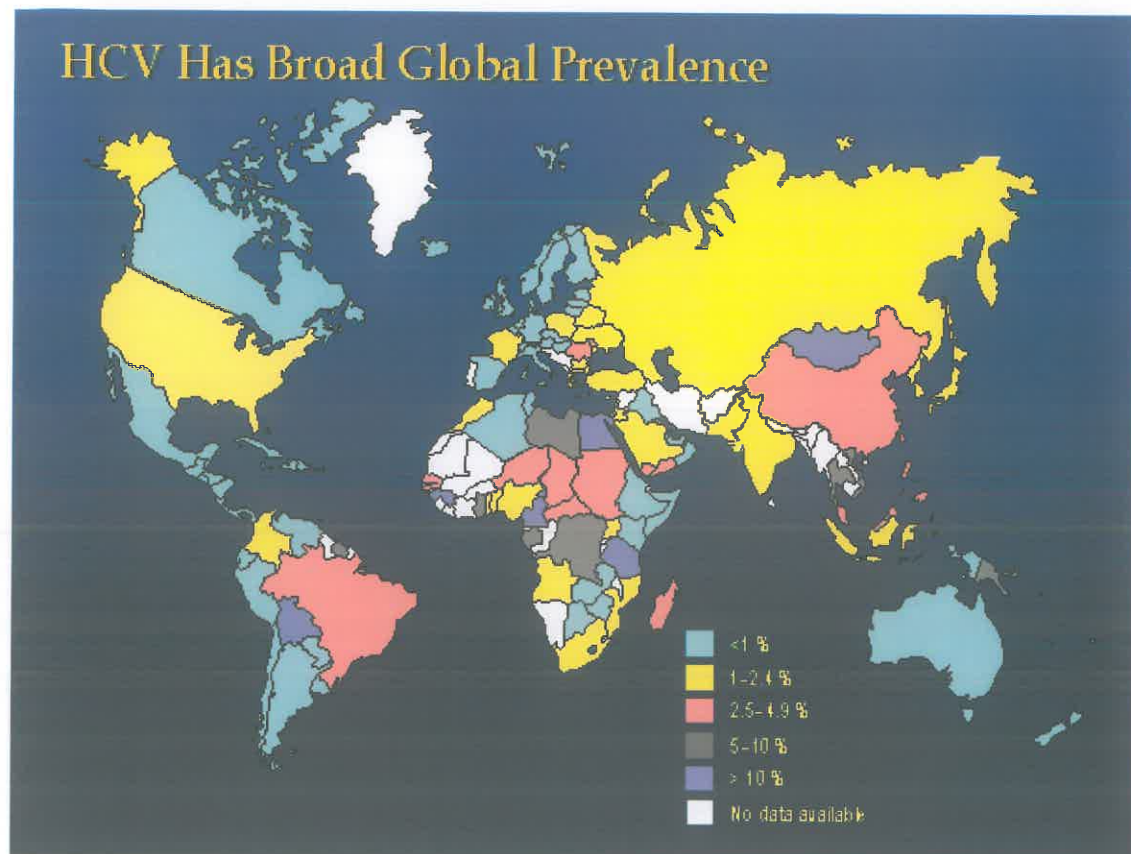


Nature Reviews | Microbiology

شکل ۲) سیکل تکثیر ویروس درون هپاتوسیت

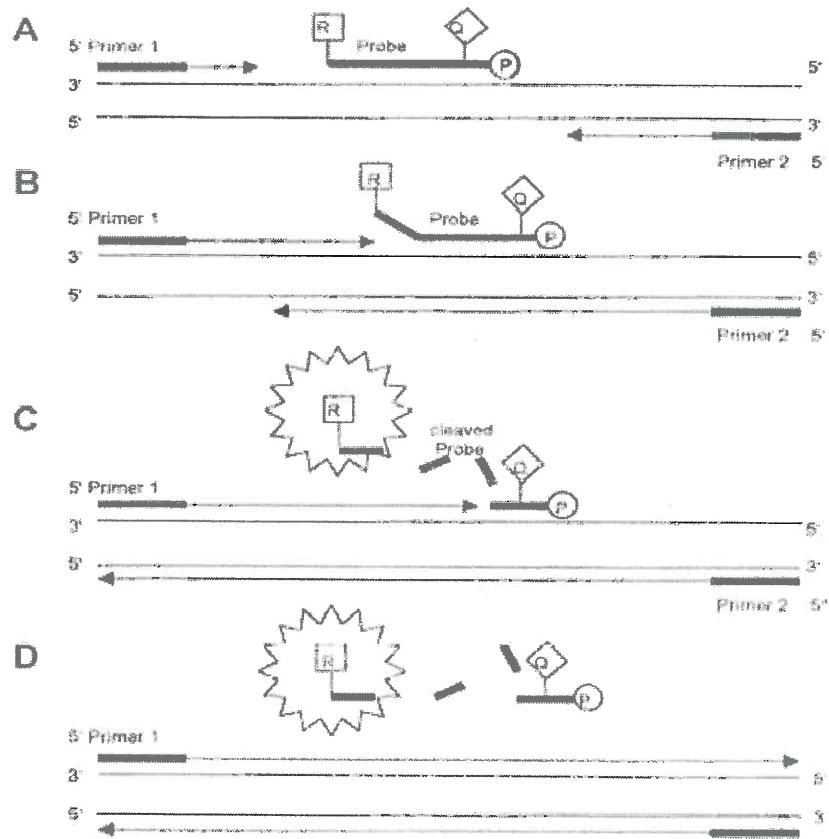
مرجع: Darius Moradpour, François Penin & Charles M. Rice

Nature Reviews Microbiology 5, 453-463 (June 2007)
<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n6/images/nrmicro1645-f1.jpg>



شکل ۳) گسترش جهانی ژنوتایپ های HCV

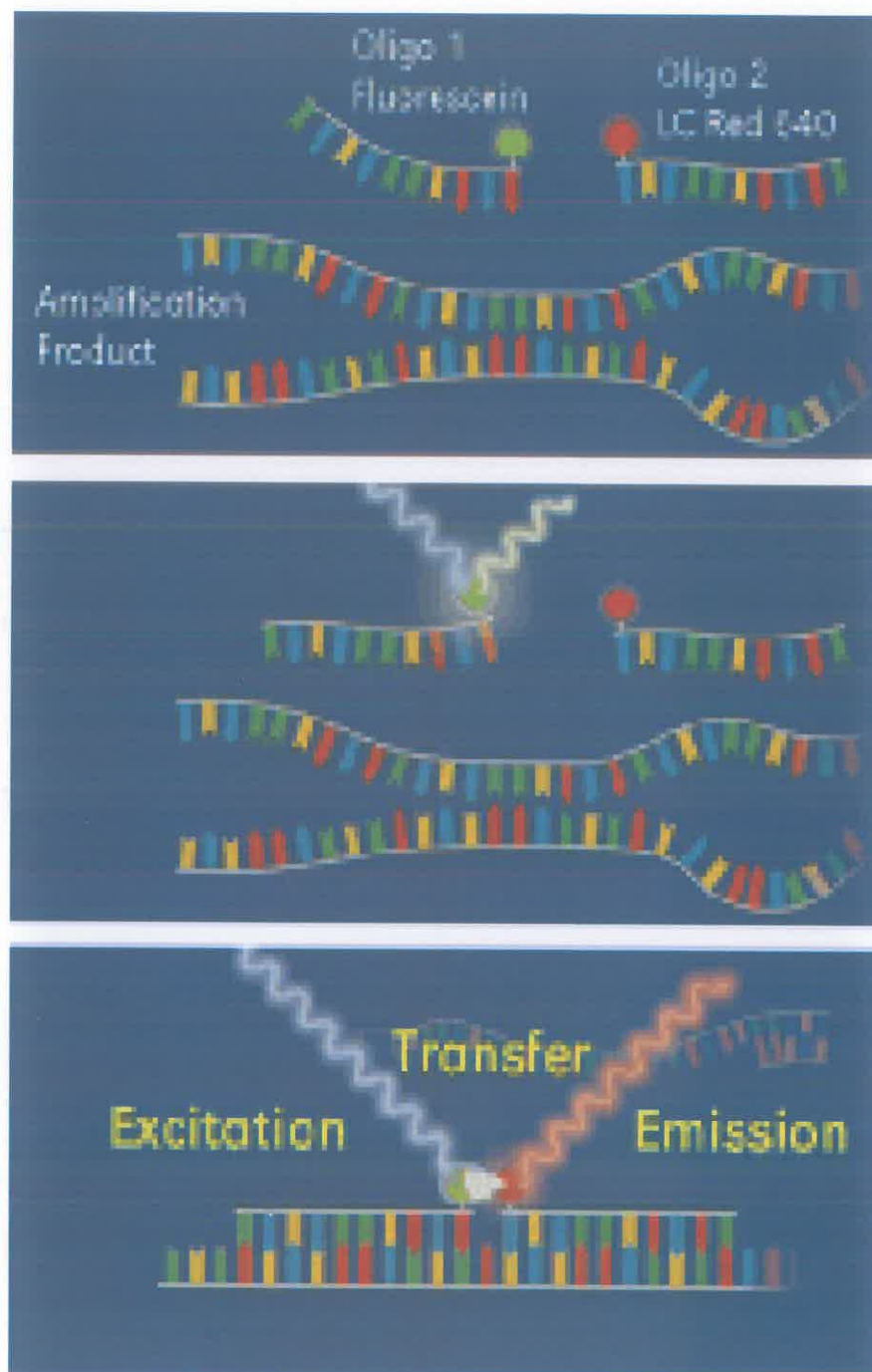
مرجع: http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/HepatitisC/prevalence.gif



شکل 4) پروب هیدرولیز

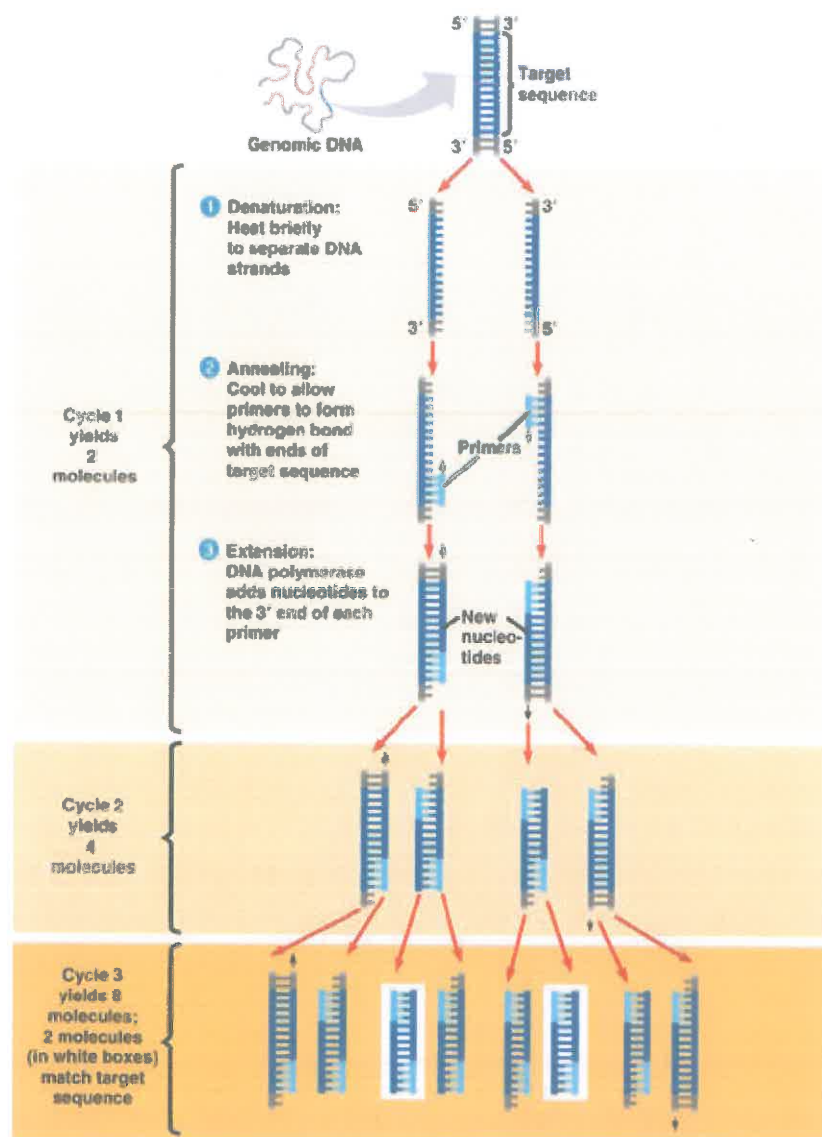
مرجع: www.thebiotechclub.org/.../Images/pharma6.gif

From the ABI Prism 7700 Sequence Detector Manual



شکل ۵) پدیده FRET و پروب های هیبریدیزاسیون

مرجع: http://www.rockwell-applied-science.com/si/si/ghttper/tt_frames/frame_hyb.htm



شکل 6) مراحل واکنش در PCR

مرجع: <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/c7.20.7.pcr.jpg>

DCCHRCYYYY NDHBRNVDRK SRVBRBYCR SCATDRRYFR VYMCYYYYKYK AGGARCKNHT
 KYBTTCMCGS RRAAGCGYC TMFCCMTGGC GTYAVYA GA GYGWYGWRYA RCMTCCRRGN
 YYCCCC TYC CGSGAGRSCC RTRGYRGTC KCRGAACCGG TGRGTWYNCC GRAATBRCYR
 GRDHGWCHGG GYCCTKKMYT GSRDHMMCC YDCTCDRYRY CYRGHVAYTT GGGCRYGCCC
 CCGSRAGAYY RCTRGCKAG TAGYGTGGG TMGCSAAMKS CCMTGXGSTA CTGCCTGATA
 GGBKGGCTTGC RARTGCCCCR KKAGGYCTCG TRSMHCRTGY AHC

شکل ۷) نقشه ژنتیکی SNP ناحیه 5'UTR از کلیه تایپ ها

LOCUS [AF009606](#) 9646 bp RNA linear VRL

DEFINITION Hepatitis C virus polyprotein gene, complete cds.

ACCESSION AF009606

DEFINITION Hepatitis C virus polyprotein gene, complete cds.

ACCESSION AF009606

FEATURES	Location/Qualifiers
Source	1..9646
	/organism="Hepatitis C virus"
	/serotype="1a"
	/isolate="H77"

GCCAGCCCC TGATGGGGC GACACTCCAC CATGAATCAC TCCCCTGTGA GGAAGTACTG
 TCTTCACGCA GAAAGCGTCT AGCCATGGCG TTAGTATGAG TGTCGTGCAG CCTCCAGGAC
 CCCCCCTCCC GGGAGAGCCA TAGTGGTCTG CGGAACCGGT GAGTACACCG GATTGCCAGG
 AACGACCGGG TCCTTTCTTG GATAAACCCG CTCAATGCCT GGAGATTTGG GCGTGCCCCC
 GCAAGACTGC TAGCCGAGTA GTGTTGGGTC GCGAAAGGCC TTGTGGTACT GCCTGATAGG
 GTGCTTGCGA GTGCCCCGGG AGGTCTCGTA GAC

شکل ۸) نقشه SNP ناحیه 5'UTR سروتایپ 1a

1. Bukh, J., R. H. Miller, and R. H. Purcell. 1995. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 15:41-63.
2. Bullock, G. C., D. E. Bruns, and D. M. Haverstick. 2002. Hepatitis C genotype determination by melting curve analysis with a single set of fluorescence resonance energy transfer probes. *Clin Chem* 48:2147-54.
3. Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169-93.
4. Choo, Q. L., A. J. Weiner, L. R. Overby, G. Kuo, M. Houghton, and D. W. Bradley. 1990. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull* 46:423-41.
5. Davis, G. L., R. Esteban-Mur, V. Rustgi, J. Hoefs, S. C. Gordon, C. Trepo, M. L. Shiffman, S. Zeuzem, A. Craxi, M. H. Ling, and J. Albrecht. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339:1493-9.
6. Davis, G. L., and J. Y. Lau. 1997. Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. *Hepatology* 26:122S-127S.
7. Dubuisson, J. 2007. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 13:2406-15.
8. Farci, P. 2002. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome [Science 1989;244:359-362]. *J Hepatol* 36:582-5.
9. Farci, P., H. J. Alter, D. Wong, R. H. Miller, J. W. Shih, B. Jett, and R. H. Purcell. 1991. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 325:98-104.

10. Fried, M. W. 2004. Viral factors affecting the outcome of therapy for chronic hepatitis C. *Rev Gastroenterol Disord* 4 Suppl 1:S8-S13.
11. Galperin, M. Y. 2008. The Molecular Biology Database Collection: 2008 update. *Nucleic Acids Res* 36:D2-4.
12. Germer, J. J., P. N. Rys, J. N. Thorvilson, and D. H. Persing. 1999. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analysis of products generated with the Amplicor HCV test. *J Clin Microbiol* 37:2625-30.
13. Gut, M., C. M. Leutenegger, J. B. Huder, N. C. Pedersen, and H. Lutz. 1999. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *J Virol Methods* 77:37-46.
14. Han, J. H., V. Shyamala, K. H. Richman, M. J. Brauer, B. Irvine, M. S. Urdea, P. Tekamp-Olson, G. Kuo, Q. L. Choo, and M. Houghton. 1991. Characterization of the terminal regions of hepatitis C viral RNA: identification of conserved sequences in the 5' untranslated region and poly(A) tails at the 3' end. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1711-5.
15. Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh, and R. Griffith. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10:413-7.
16. Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11:1026-30.
17. Hijikata, M., N. Kato, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, S. Ohkoshi, and K. Shimotohno. 1991. Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 175:220-8.
18. Houghton, M., A. Weiner, J. Han, G. Kuo, and Q. L. Choo. 1991. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 14:381-8.
19. Hu, Y. W., E. Balaskas, M. Furione, P. H. Yen, G. Kessler, V. Scalia, L. Chui, and G. Sher. 2000. Comparison and application of a novel genotyping method, semiautomated primer-specific and mispair extension analysis, and four other genotyping assays for detection of hepatitis C virus mixed-genotype infections. *J Clin Microbiol* 38:2807-13.

20. Kato, N. 2000. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microb Comp Genomics* 5:129-51.
21. Kolykhalov, A. A., E. V. Agapov, K. J. Blight, K. Mihalik, S. M. Feinstone, and C. M. Rice. 1997. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science* 277:570-4.
22. Larke, B., Y. W. Hu, M. Krajden, V. Scalia, S. K. Byrne, L. R. Boychuk, and J. Klein. 2002. Acute nosocomial HCV infection detected by NAT of a regular blood donor. *Transfusion* 42:759-65.
23. Liang, T. J., B. Rehermann, L. B. Seeff, and J. H. Hoofnagle. 2000. Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann Intern Med* 132:296-305.
24. Lindh, M., and C. Hannoun. 2005. Genotyping of hepatitis C virus by Taqman real-time PCR. *J Clin Virol* 34:108-14.
25. Livak, K. J., S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4:357-62.
26. Lopez-Labrador, F. X., S. Ampurdanes, X. Forns, A. Castells, J. C. Saiz, J. Costa, J. Bruix, J. M. Sanchez Tapias, M. T. Jimenez de Anta, and J. Rodes. 1997. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with HCV infection: relationship between HCV genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 27:959-65.
27. Maglott, D., J. Ostell, K. D. Pruitt, and T. Tatusova. 2005. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res* 33:D54-8.
28. McHutchison, J. G., S. C. Gordon, E. R. Schiff, M. L. Shiffman, W. M. Lee, V. K. Rustgi, Z. D. Goodman, M. H. Ling, S. Cort, and J. K. Albrecht. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339:1485-92.
29. Moghaddam, A., N. Reinton, and O. Dalgard. 2006. A rapid real-time PCR assay for determination of hepatitis C virus genotypes 1, 2 and 3a. *J Viral Hepat* 13:222-9.

30. Mondelli, M. U., and E. Silini. 1999. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol* 31 Suppl 1:65-70.
31. Morrison, T. B., J. J. Weis, and C. T. Wittwer. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954-8, 960, 962.
32. Okamoto, H., Y. Sugiyama, S. Okada, K. Kurai, Y. Akahane, Y. Sugai, T. Tanaka, K. Sato, F. Tsuda, Y. Miyakawa, and et al. 1992. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. *J Gen Virol* 73 (Pt 3):673-9.
33. Purcell, R. H., H. J. Alter, and J. L. Dienstag. 2000. Non-A, non-B hepatitis. 1976. *Yale J Biol Med* 73:175-82.
34. Rolfe, K. J., G. J. Alexander, T. G. Wreghitt, S. Parmar, H. Jalal, and M. D. Curran. 2005. A real-time Taqman method for hepatitis C virus genotyping. *J Clin Virol* 34:115-21.
35. Samimi-Rad, K., R. Nategh, R. Malekzadeh, H. Norder, and L. Magnus. 2004. Molecular epidemiology of hepatitis C virus in Iran as reflected by phylogenetic analysis of the NS5B region. *J Med Virol* 74:246-52.
36. Schroter, M., B. Zollner, P. Schafer, O. Landt, U. Lass, R. Laufs, and H. H. Feucht. 2002. Genotyping of hepatitis C virus types 1, 2, 3, and 4 by a one-step LightCycler method using three different pairs of hybridization probes. *J Clin Microbiol* 40:2046-50.
37. Seeff, L. B., Z. Buskell-Bales, E. C. Wright, S. J. Durako, H. J. Alter, F. L. Iber, F. B. Hollinger, G. Gitnick, R. G. Knodell, R. P. Perrillo, and et al. 1992. Long-term mortality after transfusion-associated non-A, non-B hepatitis. The National Heart, Lung, and Blood Institute Study Group. *N Engl J Med* 327:1906-11.
38. Silini, E., F. Bono, A. Cividini, A. Cerino, S. Bruno, S. Rossi, G. Belloni, B. Brugnetti, E. Civardi, L. Salvaneschi, and et al. 1995. Differential distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with and without liver function abnormalities. *Hepatology* 21:285-90.

39. Soetjipto, R. Handajani, M. I. Lusida, S. Darmadi, P. Adi, Soemarto, S. Ishido, Y. Katayama, and H. Hotta. 1996. Differential prevalence of hepatitis C virus subtypes in healthy blood donors, patients on maintenance hemodialysis, and patients with hepatocellular carcinoma in Surabaya, Indonesia. *J Clin Microbiol* 34:2875-80.
40. Stramer, S. L. 2000. Nucleic acid testing for transfusion-transmissible agents. *Curr Opin Hematol* 7:387-91.
41. Stuyver, L., R. Rossau, A. Wyseur, M. Duhamel, B. Vanderborght, H. Van Heuverswyn, and G. Maertens. 1993. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 74 (Pt 6):1093-102.
42. Szabo, E., G. Lotz, C. Paska, A. Kiss, and Z. Schaff. 2003. Viral hepatitis: new data on hepatitis C infection. *Pathol Oncol Res* 9:215-21.
43. Tyagi, S., and F. R. Kramer. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 14:303-8.
44. Wittwer, C. T., M. G. Herrmann, A. A. Moss, and R. P. Rasmussen. 1997. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22:130-1, 134-8.
45. Zein, N. N. 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev* 13:223-35.
46. Zein, N. N., J. Rakela, E. L. Krawitt, K. R. Reddy, T. Tominaga, and D. H. Persing. 1996. Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative Study Group. *Ann Intern Med* 125:634-9.