وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده میگوی کشور

عنوان:

ساخت و بهینه سازی کیت مولتی پلکس تشخیص بیماری ویروسی لکه سفید (WSSV) در میگو

مجری:
محمدخلیل پذیر

شماره ثبت
٦١٥٦٠

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده میگوی کشور

عنوان طرح/پروژه: ساخت و بهینه سازی کیت مولتی پلکس تشخیص بیماری ویروسی لکه سفید (WSSV) در میگو
کد مصوب: ۹۸۱۱۴۹-۰۲۵-۱۲-۸۰-۲
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: محمدخلیل پذیر
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری: محمدخلیل پذیر
نام و نام خانوادگی همکار(ان): عقیل دشتیان‌نسب، خسرو آئین جمشید، مریم میربخش، اشکان اژدری، امیر حسین احمدی، محمد مهدی سیمرونی، بهرام احمدی، سید احمد قاسمی، سید محمد ابراهیم جلیل ذریه زهرا، اسکندر حسین نژاد لزجانی، محمود حافظیه، بابک قائدنیا، ابوالفضل سپهداری، شاپور کاکولکی، محمد حبیبی، لاله معظمی، زینب نوروزی، سیدرضا سیدمرتضائی، احترام محمدی، محمد علی نظاری، مرتضی بحرانی، کامران آبسالان فرد، سحر ابراهیمی حسینی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): سید قاسم حسینی سالکده
نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -
محل اجرا: استان بوشهر
تاریخ شروع: ۱۳۹۸/۱۰/۱
مدت اجرا: ۱ سال و ٦ ماه
ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار: سال ۱۴۰۱
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: ساخت و بهینه سازی کیت مولتی پلکس تشخیص بیماری ویروسی لکه سفید (WSSV) در میگو

کد مصوب: ۹۸۱۱۴۹-۰۲۵-۱۲-۸۰-۲

شماره ثبت (فروست) : ٦١٥٦٠ تاریخ : ١٤٠١/٢/٣١

با مسئولیت اجرایی جناب آقای محمدخلیل پذیر دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بهداشت و بیماری‌های آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان در تاریخ ۱۴۰۱/۱/۲۹ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده ■ مرکز □ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده میگوی کشور مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۲
۲-۱- طراحی پرایمر ۸
۲-۲- بررسی قابلیت تشخیص پرایمرهای طراحی شده ۹
۲-۲-۱- سنتز پرایمر ۱۰
۲-۳- جمع آوری نمونه و استخراج DNA نمونه‌های جمع آوری شده ۱۰
۲-۳-۱- آزمون تأئید ویروس بیماری لکه سفید ۱۱
۲-۴- تکثیر ماده ژنتیکی توسط پرایمرهای بکار رفته در کیت مولتی‌پلکس ۱۱
۲-۴-۱- استخراج ماده ژنتیکی DNA ۱۱
۲-۵- شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۱۳
۲-۵-۱- بررسی کیفیت محصول PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده ۱۴
۲-۵-۲- تولید کیت مولتی پلکس تشخیص بیماری لکه سفید ۱۵
۲-۵-۳- دستورالعمل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) کیت مولتی‌پلکس ۱۵
۲-۶- ارزیابی دقت پرایمرهای طراحی شده با کیت IQ 2000-WSSV و OIE ۱۶
۲-۷-۱- ارزیابی میزان حساسیت کیت مولتی‌پلکس از طریق روش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ۱۷
۲-۸- ارزیابی میزان حساسیت کیت مولتی‌پلکس از طریق ریل تایم (RT-PCR) ۱۷
۲-۹- تعیین میزان تکرار پذیری ۱۹
۲-۱۰- تعیین اختصاصیت و ویژگی کیت مولتی پلکس طراحی شده برای تشخیص بیماری ویروسی لکه سفید ۱۹
۲-۱۱- توالی یابی (Sequencing) محصولات PCR بدست آمده ۱۹
۳- نتایج ۲۰
۳-۱- دقت کیت مولتی‌پلکس طراحی شده با کیت IQ 2000-WSSV و OIE ۲۰
۳-۲- حساسیت کیت مولتی‌پلکس طراحی شده با کیت IQ 2000-WSSV و OIE ۲۰
۳-۳- میزان تکرار پذیری ۲۲
۳-۴- اختصاصیت و ویژگی کیت مولتی پلکس طراحی شده ۲۳
۳-۵- مقایسه عملکرد کیت مولتی‌پلکس طراحی شده با کیت IQ 2000-WSSV و OIE ۲۳
۳-۶- توالی یابی (Sequencing) محصولات PCR بدست آمده ۲۴

۴- بحث..... ۲۶
منابع..... ۳۱
چکیده انگلیسی..... ۳۴

چکیده

بیماری ویروسی لکه سفید از جمله بیماری‌هایی بوده که در طول ۱۵ سال گذشته منجر به تحمیل هزینه‌های هنگفتی به صنعت تکثیر و پرورش میگو شده است. با توجه به عدم امکان درمان این بیماری، تشخیص به موقع و سریع بیماری در مراکز تکثیر و پرورش میگو با استفاده از کیت‌های تشخیص مولکولی PCR از جمله روش‌های پیشگیری از شیوع بیماری است. از سوی دیگر با توجه به عدم وجود محصول داخلی با کارایی تشیخص بالا، بیشتر مراکز آزمایشگاهی آبزیان در کشور بالاجبار از محصولات وارداتی نظیر کیت تشخیص بیماری ویروسی لکه سفید IQ2000-WSSV استفاده می‌نمایند. در این مطالعه سعی شد بر اساس توالی‌های مربوط به سویه‌های مختلف ویروس لکه سفید (چین، تایلند، تایوان و کره) و پروتئین‌های بیماریزای ویروس (VP28, VP19) پرایمرهای مختلف طراحی گردند. همزمان پس از بهینه سازی درجه حرارت و تنظیم سیکل‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز هر یک از پرایمرهای طراحی شده، محصولی تولید شد که قادر به تشخیص یک کپی از ویروس لکه سفید در نمونه با دقت بالا همراه با تکرار پذیری و اختصاصیت می‌باشد. این محصول قادر است در مدت زمان حداکثر ۳/۵ ساعت از زمان استخراج DNA ویروس شناسایی را انجام دهد. کیت مولتی‌پلکس طراحی شده حاول یک بافر M و P همراه با نمونه‌های کنترل مثبت و منفی می‌باشد. دستورالعمل اجرایی کیت طراحی شده جهت شناسایی ویروس بدین صورت است که بعد از مخلوط نمودن ۱۵ میکرولیتر بافر M و ۱۴ میکرولیتر بافر P به ازای هر نمونه در میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری استریل و افزودن ۱ میکرولیتر DNA استخراج شده از نمونه‌های مجهول با غلظت ۴۰۰-۲۰۰ نانوگرم/میکرولیتر، مثبت بودن نمونه‌ها مشروط به تکثیر هر یک از قطعات ۶۱۵، ۳۰۰ و ۲۰۰ جفت باز و منفی بودن آنها ناشی از روئت قطعه ۹۹۹ جفت است.

لغات کلیدی: ویروس لکه سفید، کیت مولتی‌پلکس، تشخیص مولکولی، پرایمر، سویه