مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحات ۸۸- ۷۳

Online ISSN: ٤٤٩٣-٢٤٧٦
Print ISSN: ٢٠٢٠-٢٥٣٨
www.irijournals.com

طراحی و توسعه Dual-probe Real Time PCR جهت شناسایی کمی ویروس هپاتیت B

علی ناظمی[۱]، ملیکه پورهاشم[۲]

[۱] هیئت‌علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

[۲] کارشناسی ارشد زیست‌شناسی و سلولی مولکولی-ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

چکیده

هپاتیت یک بیماری است که کبد را متورم کرده و فعالیت آن را مختل می‌سازد. اغلب از راه تزریق خون آلوده و فراورده‌های خونی آلوده منتقل می‌شود. با وجود در دسترس بودن واکسن جهانی، عفونت ویروس هپاتیت Bتأثیر زیادی بر سلامت عمومی در سراسر جهان دارد و تشخیص دقیق و به‌موقع عفونت HBV مورد نیاز است. تحولات سریعی در روش‌های تشخیصی و پایش عفونت HBV، ازجمله روش‌های سرولوژی و مولکولی ایجاد شده است. آزمایش کیفی سطح آنتی ژن هپاتیت B (HBsAg) مدت طولانی است که به‌عنوان یک نشانگر تشخیصی برای افراد آلوده به HBV عمل می‌کند. اخیراً، از سطح HBsAg برای پیش‌بینی نتیجه درمان در اوایل درمان استفاده شده است. بااین‌حال، شناسایی موارد مثبت HBV DNA که HBsAg قابل تشخیص ندارند، استفاده از آزمایشات مولکولی را تشویق کرده است همچنین از سوی دیگر تشخیص کمی ویروس در روند درمان و دارویی بسیار مؤثر می‌باشد. ازاین‌رو، هدف ما از تحقیق طراحی و توسعه Dual-probe Real Time PCR جهت شناسایی کمی ویروس هپاتیت B بوده است. برای این مقاله ابتدا ۵ نمونه هپاتیت B از مراکز آزمایشگاهی تهیه و پرایمرها، پروب ها و کالیبراتور مناسب با رقت ۱۰۰،۱۰۰۰،۱۰۰۰۰ تهیه گردید و تکنیک Realtime-PCR با برنامه دمایی بهینه شده و مقادیر واکنش مناسب انجام شد و در نهایت نتایج بدست آمده از تحقیق ما با کیت مورد استفاده Genrproof در آزمایشگاه‌ها مقایسه گردید. نتایج حاصل از کار ما نشان داد که سیستم پرایمر و پروب طراحی شده با فرمت هیدرولیز کارایی خوب و مناسبی برای تشخیص کمی ویروس هپاتیت B دارد و همچنین طراحی و ساخت کالیبریتور و تبدیل عددی آن هم از صحت مناسبی برخوردار می‌باشد و می‌توان از این سیستم در شناسایی Viral Load در مراکز بالینی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تکنیک Dual-probe Real Time PCR، هپاتیت B، ساخت کالیبراتور

مقدمه

به‌عنوان انگلی‌های داخل سلولی اجباری، ویروس‌ها برای ایجاد محیطی مطلوب برای تکثیر به سلول میزبان احتیاج دارند. درنتیجه، ویروس‌ها اغلب سازوکارهایی را برای براندازی فرایندهای سیگنالینگ سلولی میزبان در پیش می گیرند. گرچه فرایندهای سیگنالینگ برای چرخه تکثیر ویروسی مفید است، اما فرایند های ویروسی از روند سیگنالینگ سلولی میزبان می‌تواند برای فیزیولوژی سلول میزبان مضر باشد و می‌تواند منجر به بیماری زایی مرتبط با ویروس شود، ازجمله، برای ویروس‌های سرطان زا، تبدیل سلول و پیشرفت سرطان. ویروس هپاتیت B (HBV[1]) ازجمله این ویروس‌های سرطان زا است. با وجود در دسترس بودن واکسن HBV، ۳۵۰-۵۰۰ میلیون نفر در سراسر جهان به طور مزمن به HBV آلوده شده اند و تعداد قابل توجهی از این افراد مبتلا به سرطان سلول های کبدی (HCC[2]) مبتلا می شوند. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می دهد که عفونت مزمن با HBV عامل اصلی خطر ابتلا به HCC است. در سطح جهانی، HCC دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان است، و بر لزوم درک مکانیسم هایی که برای تکثیر HBV و توسعه HCC مرتبط با HBV تأکید دارند. HBV نمونه اولیه خانواده هپادناویریده است. اعضای این خانواده از ویروس‌ها میزبان های محدودی دارند و عمدتا سلول های کبدی را در میزبان های خود آلوده می کنند. ژنوم بسیار کوچک و جمع و جور هپادناویریده، آرایش منحصر به فرد قاب های باز خواندن، و یک استراتژی تکثیر با استفاده از رونویسی معکوس از یک واسطه RNA برای تولید ژنوم DNA از ویژگی های متمایز هپادناویریده است.

در حالی که کشف HBV انسان، که از این پس HBV نامیده می شود، در دهه ۱۹۶۰ اتفاق افتاد، تحقیقات اخیر نشان داده است که ویروس‌های هپاتیت B واقعاً از زمان دایناسورها وجود داشته اند. در حقیقت، اولین ویروس هپاتیت B شناخته شده تقریباً ۸۲ میلیون سال قدمت دارد و از DNA پرندگان آلوده از دوره مزوزوئیک شناسایی شد (۱۳). اگرچه نظریه های متعددی در مورد منشا HBV وجود دارد، اما به نظر می رسد که عفونت پستانداران یک اتفاق جدید است (۱۴)؛ و جهش در انسان ممکن است تنها در حدود ۴۰،۰۰۰ سال پیش بوده باشد. علیرغم جدول زمانی تکاملی، HBV مدرن به طرز چشمگیری شبیه به این ویروس‌های قدیمی هپاتیت B است (۱۳). هدف از این مقاله طراحی و توسعه Dual-probe Real Time PCR جهت شناسایی کمی ویروس هپاتیت B می‌باشد.

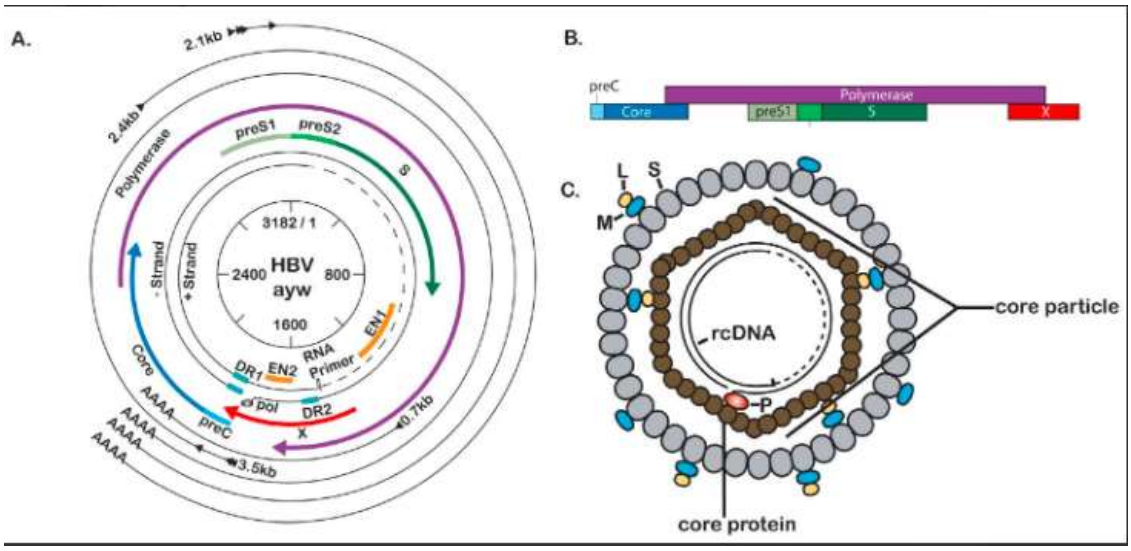
مبانی نظری

ساختار ژنوم HBV

HBV دارای یک ژنوم DNA حلقوی کوچک و دو رشته ای (۳،۲ کیلو بیس پری) است که چهار ORF را رمزگذاری می‌کند (شکل ۱).

[1] - Hepatitis B virus

[2] - Hepatocellular carcinoma



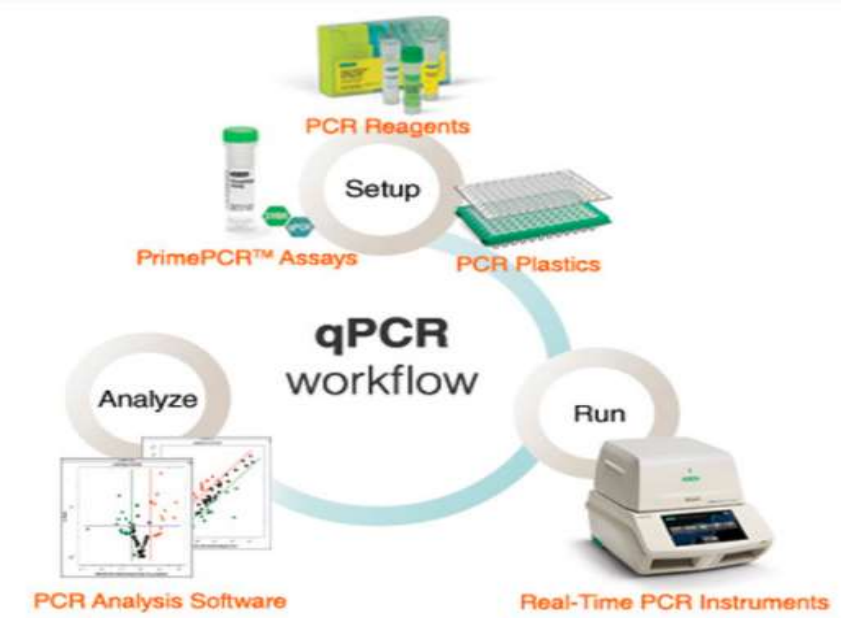
شکل۱- زیست‌شناسی مولکولی ویروس هپاتیت (HBV) B.

بزرگترین ORF، کد کننده پلیمراز ویروسی است که دارای فعالیت ترانس کریپتاز معکوس (RT) است که اولین رشته ژنوم DNA را از یک واسطه RNA تولید می‌کند. دومین ORF بزرگ سه پروتئین پاکت ویروسی را کد می‌کند: آنتی ژن سطح بزرگ (L)، میانی (M) و کوچک (S) (HBsAg).ORF دیگری پیش ماده را رمزگذاری می‌کند، همچنین به‌عنوان آنتی ژن HBV E (HBeAg) و پروتئین اصلی شناخته می شود که کپسید ویروسی را تشکیل می دهد؛ و در نهایت، کوچکترین ORF پروتئین HBV X (HBx) را کد می‌کند، یک پروتئین تنظیم کننده کوچک که نشان داده شده است برای تکثیر HBV هم در شرایط in vitro و هم در داخل بدن مورد نیاز است (۲۹-۲۵).ORF های ویروسی در RNA های مشخص کپ و پلی آدنیله کدگذاری می شوند که می‌توانند به نسخه های ژنومی و زیر ژنومی تقسیم شوند. نسخه های رونویسی زیر ژنومیک فقط به‌عنوان الگوهای پروتئین های HBV عمل می کنند و به ترتیب از رونوشت ۰,۷ کیلو بیس پری، کد کننده HBx، و رونوشت های HBsAg 2.1 کیلو بیس پری و ۲,۴ کیلو بیس پری به ترتیب Mو S-HBsAg و HBsAg تشکیل شده اند. رونوشت های ژنومی به‌عنوان mRNA برای پیش ماده، هسته و پلیمراز عمل می کنند. رونوشت ژنومی که هر دو هسته و پلیمراز را رمزگذاری می‌کند چند منظوره است و از آن به‌عنوان RNA پراژنومیک (pgRNA) یاد می شود. pgRNA الگویی برای همانندسازی HBV است و برای تولید ژنوم HBV DNA رونویسی معکوس می شود. از آنجا که ژنوم ویروسی فقط ۳,۲ کیلو بیس پری و pgRNA 3.5 کیلو بیس پری است، pgRNA کپی نهایی از ژنوم ویروسی بزرگتر از طول واحد است. همه رونوشت های HBV RNA دارای سایت پلی آدنیلاسیون یکسان هستند و هر یک از رونوشت های کوچکتر انتهای ۳ 'هر یک از رونوشت های بزرگتر را تشکیل می دهند. این بدان معنی است که توالی رونوشت HBx در انتهای ۳ 'همه نسخه های mRNA HBV موجود است، در حالی که بزرگترین رونوشت نسخه ویروسی است که حاوی توالی است که با سایر رونوشت ها به اشتراک گذاشته نمی شود (۱۱،۳۰،۳۱). رونویسی RNA های HBV از توالی های پروموتر خاص در ژنوم ویروسی هدایت می شود. حداقل برخی از محدودیت های هپاتوتروپیک HBV را می‌توان به فعال سازی رونویسی توسط عوامل رونویسی اختصاصی سلول های کبدی نسبت داد. به‌عنوان مثال، فعال سازی پروموتر / Enhancer I HBx اولین قدم ضروری در رونویسی ویروسی است، زیرا اعتقاد بر این است که رونویسی را از پروموترهای پایین دستی

افزایش می دهد. تعدادی از فاکتورهای رونویسی که به پروموتر EN1 / HBx ترسیم شده اند، مختص کبد هستند، ازجمله فاکتور هسته ای سلول های کبدی 1 (HNF)، HNF3 و HNF4. بسیاری از سایت های اتصال فاکتور رونویسی که در ۴ منطقه پروموتر HBV مشخص شده است، برای فاکتورهای رونویسی است که توسط پروتئین های HBV فعال می شوند، اغلب HBx، حاکی از آبشار خاص رونویسی است (۳۲). تنظیم رونویسی HBV با واسطه فاکتور رونویسی با جزئیات بیشتری در جاهای دیگر بررسی شده است (۱۱،۳۳).

Realtime-PCR

امروزه تکنیک‌های تکثیر و شناسایی اسیدهای نوکلئیک از مهم‌ترین ابزارهای پژوهش‌های زیستی و ژنتیکی به شمار می‌آیند. دانشمندان در همه زمینه‌های علوم زیستی، بیوتکنولوژی، پزشکی، پزشکی قانونی، تشخیصی و ... ازاین‌روش‌ها در طیف گسترده‌ای از کاربردها استفاده می‌کنند. برای برخی از کاربردها، تشخیص کیفی اسید نوکلئیک کافی است. در حالی که تحقیقات در سایر زمینه‌ها نیاز به تجزیه و تحلیل کمی دارند Real – Time PCR .می‌تواند برای تجزیه و تحلیل کمی و کیفی اسیدهای نوکلئیک مورد استفاده قرار گیرد. در PCR معمولی، محصول DNA تکثیر شده یا آمپلیکون در یک تحلیل نقطه انتهایی شناسایی می‌شود. در حالی که PCR در زمان واقعی، تجمع محصول ایجاد شده را در طی روند پیشرفت واکنش PCRبه طور همزمان نشان می‌دهد به طوری که کمیت محصول پس از هر بار انجام چرخه PCR اندازه‌گیری می‌شود. مراحل انجام PCR در زمان واقعی در شکل زیر مشخص شده است (۲). در اولین مرحله، اجزای واکنش‌های PCR رشته‌های هدف به همراه پرایمرهای اختصاصی آماده می‌شوند. سپس اجزای واکنش PCR با توجه به پروتکل مشخص، در لوله‌های واکنش با هم ترکیب می‌شوند و لوله‌ها درون دستگاه PCR در زمان واقعی قرار می‌گیرند. پس از تنظیم دستگاه، واکنش PCRشروع می‌شود. همزمان با شروع چرخه‌های PCR داده‌های جمع آوری شده توسط نرم افزار یا ابزار اختصاصی دستگاه مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند.



شکل۲- مراحل انجام PCR در زمان واقعی

تشخیص به وسیله تکنیک PCR در زمان واقعی، با اضافه کردن یک مولکول فلورسنت به‌عنوان گزارشگر به محصولات PCR در هر لوله واکنش انجام می‌گیرد، به طوری که با پیشرفت واکنش و افزایش مقدار DNA تولید شده در هر چرخه، فلورسانس ایجاد شده به وسیله مولکول گزارشگر نیز افزایش می‌یابد که این افزایش با حسگرهای دستگاه قابل شناسایی است. مواد شیمیایی فلورسانس به کار رفته برای این منظور شامل رنگ‌های متصل شونده به DNA و توالی‌های پرایمر یا پروب نشان دار شده با فلورسانس هستند. برای ردیابی و نظارت بر سیگنال فلورسانس این پروب‌های نشان دار شده، دستگاه‌های ترموسایکلر تخصصی مجهز به حسگرهای تشخیص فلورسانس همزمان با پیشرفت چرخه‌های PCR و تولید محصولات آن‌ها، طراحی شده است. فلورسانس اندازه‌گیری شده متناسب با مقدار کل آمپلیکون یا DNA تکثیر شده است. تغییر فلورسانس به مرور زمان برای محاسبه مقدار آمپلیکون تولید شده در هر چرخه مورد استفاده قرار می‌گیرد. مهم‌ترین مزیت PCR در زمان واقعی نسبت به PCR معمولی این است که PCR در زمان واقعی به شما امکان می‌دهد، تعداد اولیه نسخه‌های DNA الگو (توالی هدف) را با دقت و حساسیت بالا در روند انجام چرخه‌های واکنش تعیین کنید. نتایج PCR در زمان واقعی می‌تواند کیفی (تعیین حضور یا عدم وجود یک توالی) یا کمی (تعیین تعداد نسخه‌های توالی هدف) باشد PCR .در زمان واقعی کمی، نیز به‌عنوان روش qPCR یا Quantitative real-time PCR شناخته می‌شود.

PCRمعمولی در بهترین حالت می‌تواند نتایج واکنش‌ها را به صورت کیفی (با استفاده از تکنیک ژل الکتروفورز) ارائه دهد. علاوه بر این، داده‌های PCR در زمان واقعی بدون نیاز به انجام ژل الکتروفورز قابل ارزیابی هستند، به همین دلیل با PCR در زمان واقعی، در زمان و هزینه‌های انجام واکنش صرفه جویی می‌شود. در نهایت، از آن جایی که واکنش‌های این نوع از تکنیک PCR، همزمان با پیشرفت واکنش‌ها قابل ردیابی هستند؛ داده‌ها در یک سیستم qPCR یکپارچه، با لوله بسته (بدون نیاز به دستکاری واکنش‌ها) ارزیابی می‌شوند و به این ترتیب امکان ایجاد آلودگی در واکنش‌ها کاهش می‌یابد و نیاز به دستکاری‌های بعد از تکثیر یا Postamplification در تجزیه و تحلیل qPCR وجود ندارد.

آزمون PCR /qPCR در زمان واقعی به ابزار انتخابی جهت شناسایی سریع، حساس و اختصاصی رشته‌های اسیدهای نوکلئیک است و همچنین می‌تواند مقادیر کمی اسیدهای نوکلئیک را در نمونه‌های مختلف بیولوژیکی مشخص کند. تکنیک Real-time PCRدر برنامه‌های کاربردی متنوعی همچون تجزیه و تحلیل بیان ژن، تشخیص و شناسایی ارگانیسم‌های اصلاح شده ژنتیکی در مواد غذایی و ژن‌های دخیل در سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی، واکنش‌های qPCR به طور گسترده برای اندازه گیری کمی تعداد کپی‌های ژن یا به اصطلاح دوز ژن در رده‌های سلولی مختلف و یا حضور ژن‌های جهش یافته در نمونه مورد استفاده قرار می‌گیرند. چنانچه تکنیک Real-time PCRدر کنار روش PCR با رونویسی معکوس (RT-PCR) انجام شود، از این تکنیک‌ها می‌توان برای اندازه‌گیری دقیق تغییرات در بیان ژن استفاده کرد. به‌عنوان مثال، افزایش یا کاهش بیان یک ژن در پاسخ به شرایط مختلف محیطی یا درمان دارویی، با اندازه‌گیری تغییرات .mRNA در سطح سلولی قابل اندازه‌گیری است.

پیشینه تحقیق

چاوو لو و همکاران (۲۰۱۷) با استفاده از روش Real-time PCR به تعیین میزان DNA ویروس هپاتیت B پرداختند. انها یک روش مضاعف real-time PCRایجاد کردندکه از دو جفت آغازگر و دو پروب بر اساس مناطق S و C محافظت شده از ژنوم HBV استفاده شده است. انها تشخیص کمی HBV DNA نمونه های HBV را انجام دادند و نتایج آزمایش های

Real-time PCR را با آزمایش های COBAS TaqMan HBV نسخه ۲ و تست های Real-time PCR مقایسه کردند. نتایج تست Real-time PCR مطابق با آزمون های COBAS TaqMan HBV نسخه ۲ و آزمون Real-time PCR مطابقت داشت.

فرانسیسکا سوسا جورادو و همکاران (۲۰۱۸) تأثیر پرایمرهای PCR در تشخیص عفونت مخفی ویروس هپاتیت B در بیماران مکزیکی را بررسی کردند.

عفونت پنهان هپاتیت B (OBI) به‌عنوان وجود DNA ویروس هپاتیت B (HVB) در کبد افراد HBsAg منفی با یا بدون DNA ویروسی قابل تشخیص در سرم تعریف می شود. OBI یک چالش تشخیصی است زیرا با بار ویروسی بسیار کمی مشخص می شود که به طور متناوب در طول زمان قابل تشخیص است. افراد مبتلا به OBI می‌توانند به بیماری مزمن کبدی، ازجمله سیروز کبدی و کارسینوم سلولهای کبدی مبتلا شوند. هدف از این کار تولید ابزارهایی برای بهبود تشخیص OBI ژنوتیپ های HVB رایج در مکزیک بود. انها پرایمرها را برای شناسایی OBI در نمونه های سرمی توسط nested PCR و real-time PCR طراحی و آزمایش کردند. سایت های محافظت شده در ژنوم ویروسی با ترازبندی متداول ترین ژنوتیپ های HBV در مکزیک (D وG/H, F) تعیین شد و پرایمرهای پوشاننده کل ژنوم ویروسی برای اولین بار و nested PCR طراحی شدند. پرایمرها در نمونه های سرمی ۴۵ بیمار آلوده به ویروس هپاتیت C یا HIV، از یک گروه ۱۱۶ نفری مورد آزمایش قرار گرفتند. پرایمرها نیز در یک گروه کنترل با HBV مزمن آزمایش شدند. محصولات nested PCR حاصل از HBsAg (-) / anti-HBc (+) توالی یابی شدند و برای طراحی پرایمرهای real-time PCR مورد استفاده قرار گرفتند. موثرترین جفت پرایمرها برای شناسایی محصولات HBV توسط مناطق nested PCR: PreS2 / P PCR ORF، S / P، X / PreC و C بودند؛ در حالی که توسط real-time PCR آنها مناطق ORF PreS2 / P، S / P، X و .Cرا هدف قرار دادند. از ۴۵ بیمار HBsAg (-) / ضد HBc (+) آزمایش شده، ژنوم ویروسی به ترتیب در ۲۸ و ۳۴ مورد با nPCR و real-time PCR تشخیص داده شد. پرایمرهای طراحی شده برای real-time PCR تا ۷۵٫۵٪ از بیماران مشکوک به OBI مکزیکی را، با یا بدون بیماری کبد، شناسایی کردند که نشان دهنده پیشرفت نسبت به استراتژی های قبلی PCR است.

سنا عرفان و همکاران (۲۰۱۸) روش‌های Real Time PCR، Chemilluminicensce، ELISA و آزمایشات ایمونوکروماتوگرافی سریع برای تشخیص عفونت ویروس هپاتیت B را با یکدیگر مقایسه کردند.

ویروس هپاتیت B یکی از دلایل اصلی هپاتیت مزمن در کشورهای در حال توسعه است. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر شیمی درمانی، الایزا و آزمایش کروماتوگرافی ایمنی به RT_PCR برای تعیین تشخیص ویروس هپاتیت B در بیماران داخل و خارج گروه پزشکی، موسسه علوم پزشکی راجندرا انجام شد. این مطالعه توصیفی - مقطعی بر روی ۴۷۵ بیمار انجام شد. اطلاعات دموگرافیک و نمونه های سرمی بیمار از افراد جمع آوری شد. نمونه ها توسط شیمی لومینسانس، ELISA، ICT و RT-PCR برای HBV مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

در مطالعه حاضر، از مجموع ۷۰ Chemilluminicensce، ۶۴ توسط الایزا، ۶۱ توسط ICT و ۶۳ توسط RT PCR برای HBV مثبت تشخیص داده شد. با استفاده از RT PCR و Chemilluminicensce ۶۳ نمونه مثبت بودند. در کل ۲ بیمار از نظر HBV توسط RT PCR مثبت و از نظر Chemilluminicensce منفی بودند در حالی که ۷ بیمار از نظر RT-PCR منفی و با Chemilluminicensce مثبت بودند. در کل ۸ بیمار از نظر RTPCR از نظر HBV مثبت و با ELISA منفی بودند در حالی که ۵ بیمار از نظر RT-PCR منفی و از نظر ELISA مثبت بودند. در مجموع ۱۱ بیمار از نظر HBV توسط

RT PCR مثبت و از نظر ICT منفی بودند در حالی که ۳ بیمار از نظر RT-PCR منفی و از نظر ICT مثبت بودند. بیماران HBsAg منفی همچنین باید با آنتی بادی کل HBc به دلیل مشکوک به قرار گرفتن در معرض غربالگری شوند که بعداً با RT PCR تأیید می شود. روش RT-PCR به‌عنوان یک روش خاص و قابل اعتماد مناسب برای غربالگری HBV معتبر شناخته شده است و باید برای تعیین دقیق و نهایی تشخیص این بیماران توصیه شود.

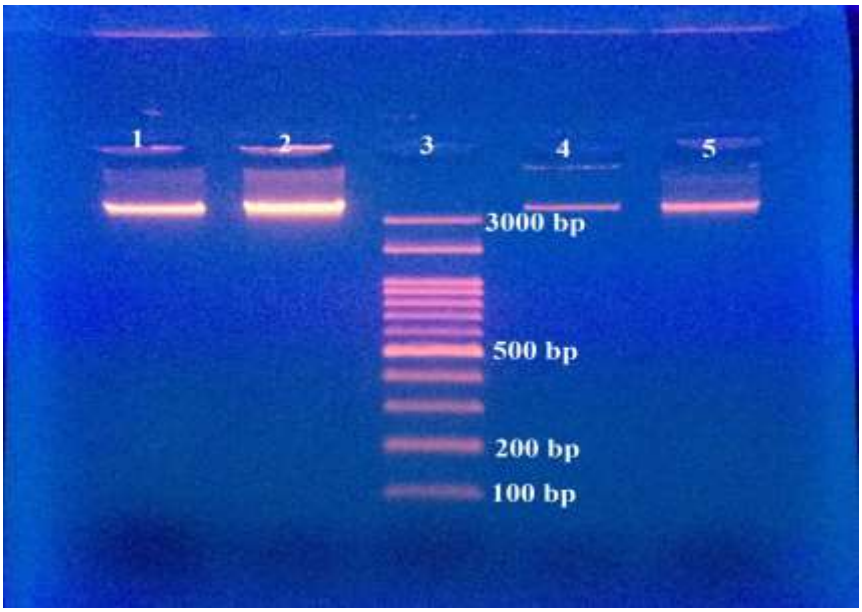
الهام صمدی و همکاران (۲۰۲۰) شیوع عفونت ویروس هپاتیت B در بیماران همودیالیزی با استفاده از Nested PCR را بررسی کردند.

عفونت هپاتیت B مخفی به دلیل عدم وجود HBsAg قابل تشخیص در سرم، علی رغم وجود DNA ویروسی داخل کبدی، و سطح پایین DNA حلقوی بسته شده کووالانسی (cccDNA) تعریف می شود. از آنجا که بیماران همودیالیزی اگر ناقل Hep B باشند، در معرض خطر بیشتری قرار دارند، زیرا می‌تواند منجر به OBI شود، این مطالعه برای تعیین شیوع OBI در بیماران همودیالیزی ساکن زنجان، ایران طراحی شده بود. انها یک آزمایش ضدHBc (ELISA) بر روی ۱۶۶ نمونه بیمار همودیالیزی HBsAg منفی انجام دادند. OBI با استفاده ازnested PCR بررسی شد. از کل بیماران همودیالیزی نمونه گیری شده، مطالعه شامل ۵۸,۴٪ مرد و ۶۱,۴۱٪ شرکت کنندگان زن بود. سن گروه مطالعه از ۱۵/۴۹ ± ۵۸/۸۹ سال بود و تقریباً ۲۷/۴ ± ۲۸/۲۷ سال دیالیز دریافت کرده بودند. علاوه بر این، ۵,۴ درصد بیماران سابقه انتقال خون داشتند، در حالی که ۵۸,۴ درصد در برابر ویروس هپاتیت B (HBV) واکسینه شده بودند. علاوه بر این، ۲۳,۵ درصد بیماران ضد HBc مثبت بودند، در حالی که ۷۶,۵ درصد بیماران آزمایش منفی داشتند. سرانجام، ۶۶,۳٪ از بیماران از نظر ضد HB مثبت بودند، در حالی که ۳۳,۷٪ از نظر ضد HBs منفی بودند. به طور کلی، این مطالعه نشان داد که شیوع OBI 6٪ بود و HBV DNA در ۱/۲٪ افرادی که علیه هپاتیت B واکسینه شده بودند تشخیص داده شد. اگرچه تفاوت معنی داری بین شیوع OBI به سن بیماران، جنس، مدت دیالیز یا سابقه انتقال خون مشخص نشد، بااین‌حال، یک رابطه قوی بین شیوع OBI به واکسیناسیون HBV پیدا شد.

نتایج انالیز کیفی اسید نوکلئیک ویروسی استخراج شده

در مراحل قبل ۵ نمونه با استفاده از کیت High Pure Viral Nucleic acid شرکت Roche آلمان طبق درستورالعمل شرکت سازنده استخراج انجام شد.

در ادامه تعدادی از نمونه ها به طوری تصادفی روی ژل آگارز مورد بررسی کیفی قرار گرفتند (شکل ۳). همانطور که در شکل مشاهده می شود تمامی نمونه های استخراج شده باندهایی شارپ و واضح دارند که نشان دهنده این می‌باشد که نمونه ها به خوبی استخراج شده اند و قابلیت استفاده در تحقیق را دارند.



شکل۳- تصویر ژل آگاروز تعدادی از DNA ژنومی ویروسی نمونه های بالینی. ردیف ۳ نشانگان وزن مولکولی ۱۰۰-۳۰۰۰ جفت بازی. ردیف های ۱، ۲، ۴و ۵ نمونه های بالینی.

طراحی توالی های پرایمری و پروب Taqman (هیدرولیز پروب) برای ژنوم هپاتیت B

بر اساس سکانس ژنوم ویروس هپاتیت B با کد دسترسی NC_003977 طراحی پرایمری و پروب مناسب برای شناسایی ویروس HBV بطور دستی طراحی و با کمک نرم افزار Oligoanalyzer On line و n-Blast ارزیابی و توالی های پرایمری و پروب مناسب زیر بدست آمد (جدول ۱).

جدول ۱- توالی های پرایمری و پروب Taqman (هیدرولیز پروب) برای ژنوم هپاتیت B

HB1 Primer:	**CAA CCT CCA ATC ACT CAC CAA C**
HB2 Primer:	**ATA TGA TAA AAC GCC GCA GAC AC**
Probe:	**FAM-TCC TCC AAT TTG TCC TGG TTA TCG CT-BHQ1**

در ادامه توالی های پرایمری و پروب در OD 3-5 توسط شرکت متابیون آلمان بطور شیمیایی سنتز گردید و طبق دستورالعمل ارسالی در غلظت ۱۰۰ پیکومول حل و سپس رقیق سازی انجام شد و تا زمان واکنش در فریزر ذخیره گردید.

طراحی و سنتز کالبریتور

توالی کالیبریتور بخشی از ژنوم ویروس HBV می‌باشد که محل اتصال توالی های پرایمری و پروب می‌باشد. این توالی که در زیر نمایش داده شده است (جدول ۲).

جدول ۲-توالی کالیبراتور

AACCTCCAATCACTCACCAACCTCTTGTCCTCCAATTTGTCCTGGCTATCGCTCGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCATAT

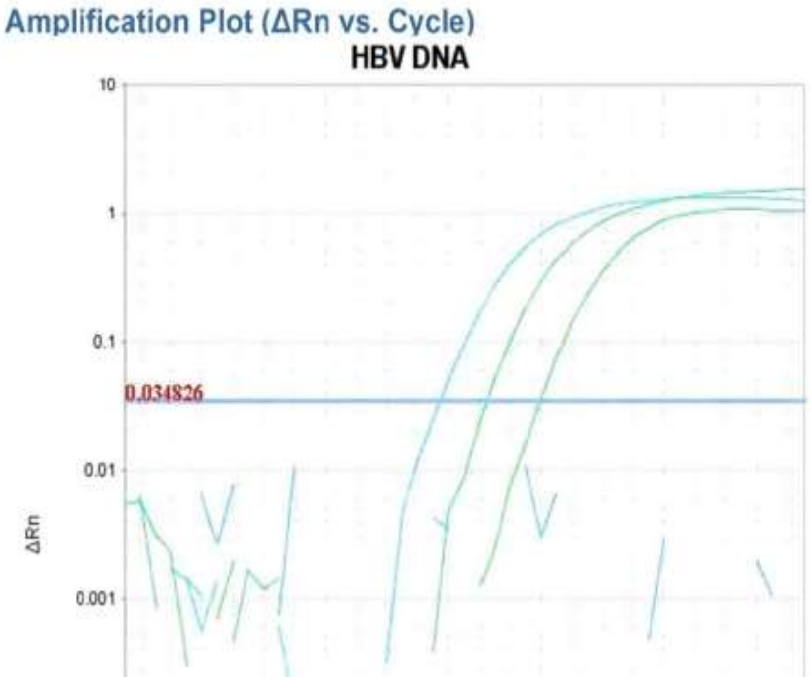
در این تحقیق توالی کالیبراتور ۸۰ نوکلئوتیدی بوده که بطور سنتتیک در غلظت ۵-۸ ODتوسط شرکت متابیون آلمان بطور شیمیایی سنتز گردید و طبق دستورالعمل ارسالی در غلظت ۱۰۰ پیکومول حل و سپس به واسطه فرمول زیر رقیق سازی به گونه ای انجام شد که در نهایت غلظت های ۱۰۰، ۱۰۰۰ و۱۰۰۰۰ نسخه ای از کالیبریتور تهیه گردید و تا زمان واکنش در فریزر ذخیره گردید.

$$\text{number of copies (molecules)} = \frac{X\ \text{ng} * 6.0221 \times 10^{23}\ \text{molecules/mole}}{(N * 660\ \text{g/mole})^{\dagger} * 1 \times 10^{9}\ \text{ng/g}}$$

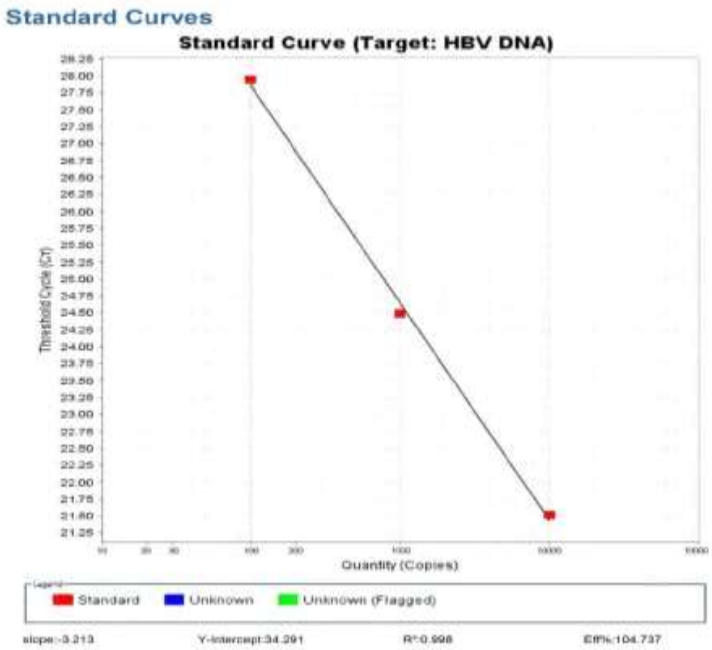
X = amount of amplicon (ng)
N = length of dsDNA amplicon
660 g/mole = average mass of 1 bp dsDNA

اجرا واکنش بهینه شده بر روی سه رقت کالیبریتور

پس از تبدیل غلظت کالیبریتور به تعداد نسخه برای کالیبریتور، ۳ رقت از کالیبریتور با تعداد نسخ های ۱۰۰ کپی، ۱۰۰۰ کپی و ۱۰۰۰۰ کپی از کالیبریتور تهیه و واکنش برای تعیین شیب خط (Slope) و R^2 انجام شد (اشکال ۴،۵). نتایج حاصله نشان می دهد که کالیبریتور تهیه شده از مطابقت عددی مناسبی برخوردار می‌باشد.



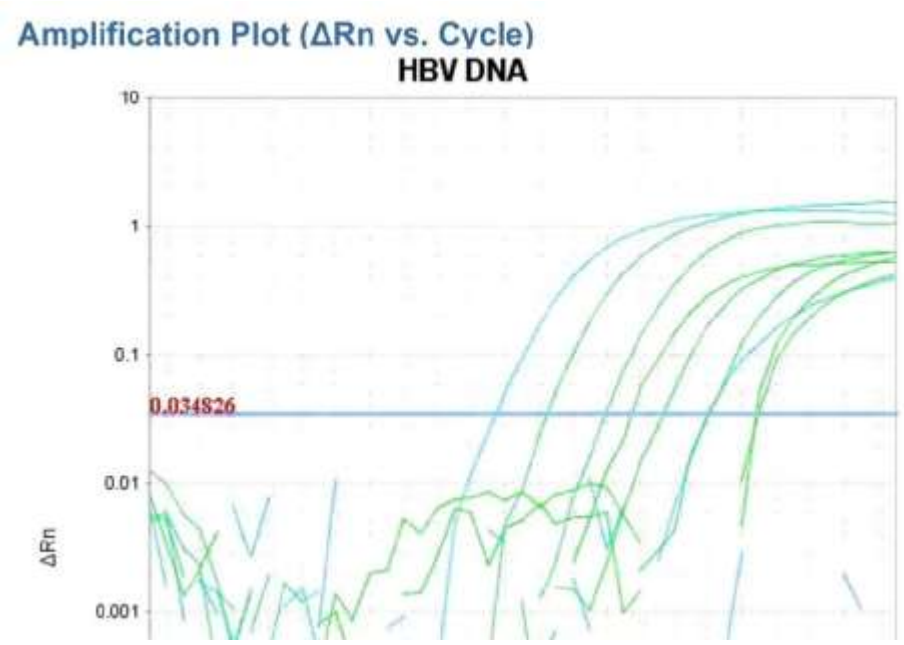
شکل۴ – تصویر نمودار های تکثیری سه رقت ۱۰۰،۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ کالیبریتور روی کانال گرین.



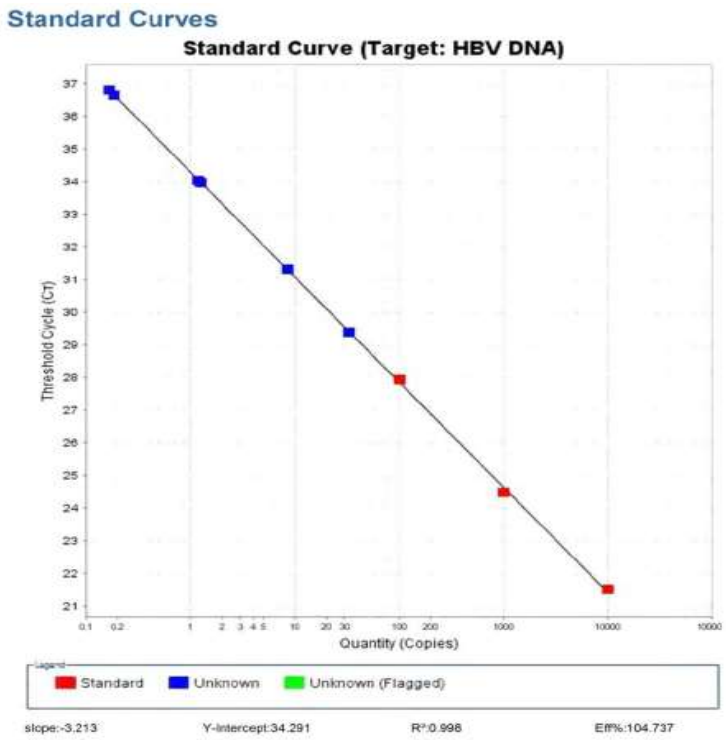
شکل۵- نمودار شیب خط استاندار های ساخته شده در این تحقیق. همانطور که مشاهده میشود شیب خط در محدوده استاندارد 3.2- و R2:1 می‌باشد.

اجرا واکنش بهینه شده بر روی نمونه های مشخص استخراج شده

در این مرحله طبق شرایط بهینه شده فوق ازمایش بر روی ۵ نمونه ای که قبلا تهیه و DNA آنها استخراج شده بود به صورت زیر انجام گرفت (شکل۶،۷):



شکل۶- نمودار تولید سیگنال هیدرولیز پروب در کانال گرین برای ۵ نمونه بالینی در حضور کالیبریتور و کنترل مثبت و منفی.



شکل۷- نمودار شیب خط استاندار ها همراه با ۵ نمونه بالینی مجهول.

در ادامه نتایج کمی بدست آمده از بررسی ۵ نمونه را می‌توان در جدول ۳ مشاهده کرد.

جدول۳- نتایج کمی ۵ نمونه بالینی محاسبه شده بر پایه کالیبریتور تهیه شده در این پروژه.

Results Table

Well	Sample	Target	Task	Quantity	CT
C1	S1	HBV DNA	UNKNOWN	0.1869	36.6309
C2	S2	HBV DNA	UNKNOWN	0.1648	36.8066
C3	S3	HBV DNA	UNKNOWN	33.6579	29.3836
C4	S4	HBV DNA	UNKNOWN	1.1933	34.0441
C5	S5	HBV DNA	UNKNOWN	8.4693	31.3092
C7	C2	HBV DNA	STANDARD	100	27.9438
C8	C3	HBV DNA	STANDARD	1000	24.4906
D1	C4	HBV DNA	STANDARD	10000	21.517
D2	Positive control	HBV DNA	UNKNOWN	1.2706	33.9565
D3	ntc	HBV DNA	UNKNOWN		Undetermined

با توجه به اینکه استخراج بر طبق پروتوکل استخراج از ۲۰۰ میکرولیتر سرم انجام شده است و در نهایت در ۵۰ میکرولیتر بافر Elution حل گردیده. نتایج عددی حاصله برای تبدیل به تعداد نسخه های موجود در هر میلی لیتر سرم باید در عدد ۲۵۰ ضرب گردند.

نتایج نهایی این تبدیل و مقادیر عددی تعیین شده آن ۵ نمونه توسط کیت های تجاری توسط سایر آزمایشگاه‌ها در جدول ۴ ارائه شده است:

جدول ۴-مقایسه نتایج بدست آمده از این پروژه و کیت های تجاری geneproof مورد استفاده در آزمایشگاه‌ها

شماره نمونه ها	نتیجه کیت تجاری سایر مراکز Geneproof (IU/ml)	نتیجه روش توسعه یافته در این پروژه (IU/ml)	میزان انحراف
S1	75	45 (0.18 *250)	1.6
S2	60	40 (0.16 * 250)	1.5
S3	9500	8400 (33.6*250)	1.13
S4	410	300 (1.2*250)	1.36
S5	2400	2100 (8.4*250)	1.14

همانطور که در جدول ۴ ملاحظه می کنید میزان انحراف نتایج عددی محاسبه شده در این پروژه با نتایج حاصله از کیت تجاری بسیار اندک بوده و می‌تواند به دلایل دیگری همچون ذخیره طولانی نمونه های سرمی که منجر به کاهش لود ویروس برای بررسی ثانویه تعداد نسخه ها در این پروژه شده اشاره نمود. در مجموع نتایج بدست آمده در این تحقیق نه تنها نشان از کارایی مناسب سیستم پرایمری و پروب طراحی شده با فرمت هیدرولیز پروب در این پروژه دارد بلکه نشان می دهد طراحی و ساخت کالیبریتور و تبدیل عددی آن هم از صحت مناسبی برخوردار می‌باشد و می‌توان از این سیستم در شناسایی Viral Load در مراکز بالینی استفاده نمود.

بحث و نتیجه گیری

هپاتیت B نوعی بیماری عفونی ویروسی در انسان است که ویروس HBVعامل آن است. بیشترین آسیب این بیماری متوجه کبد بیمار است. بافت هدف این بیماری و میزبان آن محدود و فقط در کبد، گاهی پانکراس و کلیه انسان و میمون را نیز آلوده می‌کند. ویروس این بیماری می‌تواند سبب هر دو حالت حاد یا مزمن آن شود و انتقال این ویروس با قرار گرفتن در معرض خون یا مایعات بیولوژیکی آلوده بدن فرد آلوده صورت می‌گیرد. در مناطقی که این بیماری شایع و بومزاد است، این انتقال در زمان تولد یا از راه تماس با خون افراد دیگر در دوران کودکی شایع‌ترین راه انتقال هپاتیت B است. در مناطقی که این بیماری نادر است، متداول‌ترین شیوه انتشار این عفونت از مسیر استفاده کاربران تزریق درون‌وریدی مواد مخدر، و مقاربت جنسی است. طبق امار در سال ۲۰۱۵ حدود ۱,۳۴ میلیون مرگ ناشی از هپاتیت ب در سراسر جهان وجو داشته است و بیشترین (۷۲۰،۰۰۰) مورد مرگ ناشی از هپاتیت به دلیل سیروز کبدی و به دنبال آن سرطان اولیه کبد یعنی کارسینوم هپاتوسلولار (۴۷۰،۰۰۰ مرگ) بوده است. در سطح جهانی، حدود ۲۵۷ میلیون نفر در سال ۲۰۱۵ با عفونت مزمن هپاتیت B (HBV) زندگی می کردند و شیوع جهانی عفونت HBV در جمعیت عمومی ۳,۵٪ است.

HBV از خانواده Hepadenaviridae می‌باشد و این ویروس کوچک، دارای پوشش، دارای DNA دو رشته و حلقویست که قسمتی از آن تک رشته‌ای است و طول ژنوم رشته کامل دارای ۳۳۲۰-۳۰۲۰ نوکلئوتید و ژنوم رشته کوتاهتر دارای ۲۸۰۰-۱۷۰۰ نوکلئوتید است؛همچنین دارای آنزیم ریورز ترانس کرپیتاز (RTase) است که این آنزیم چسبیده به ژنوم ویروس و دارای فعالیت ریبونوکلئاز است. این ویروس دارای ۳ نوع آنتی ژن مهم به نام‌های آنتی ژن سطحی، آنتی ژن مرکزی و یک آنتی ژن دیگر است. پوشش ویروس هپاتیت B شامل سه پلی پپتید به صورت همپوشان است که پروتئین‌های اصلی

Small (S)، Middle (M)و Large (L) را به وجود می‌آورد و به ترتیب توسط سکانس‌های ژنیS ، Pre-S1و Pre-S2 کدگذاری می‌شوند.

عفونت ویروس هپاتیت(HBV) B امروزه از مهمترین مشکلات بهداشتی جهانی است و برای تشخیص عفونت HBV از سایر هپاتیت ها که عامل بیماری زایی هستند، روش‌های تشخیصی خاصی لازم است ؛ ازاین‌رو، آزمایشات بالینی ضروری می‌باشد. تشخیص HBV اساساً مبتنی بر تشخیص آنتی ژن هایHBV ، آنتی بادی های انسانی در برابر این آنتی ژن ها و همچنین وجود اسیدهای نوکلئیک ویروسی (HBV DNA) است که در درجه اول در خون و به دنبال آن کبد و در سایر نقاط کبدی در شرایط خاص وجود دارد.

بر اساس وجود یا عدم وجود ترکیبی از آنتی ژن ها / آنتی بادی ها، عفونت های حاد / مزمن، مداوم / گذشته با HBV را می‌توان تشخیص داد. در میان نشانگرهای مختلف، تشخیص آزمایشگاهی عفونت HBV تا حد زیادی بر اساس تشخیص ایمنی HBsAg است. با این وجود مسئله عدم شناسایی HBsAg به دلیل جهش های فرار تشخیصی در اپی توپ ها یا به دلیل سطح آنتی ژن پایین، اهمیت استفاده از ابزارهای بیولوژیک مولکولی قوی را برای تشخیص کارآمد HBV بسیار تأکید کرده است. با این وجود، پیشرفت سنجش های مولکولی همچنین زمینه تشخیص مولکولی HBV را تا حد زیادی تقویت کرده است. روش‌های مولکولی شامل تکنیک های مبتنی بر چرخه حرارتی برای تکثیر HBV DNA، مانند واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، qPCR یا NASBA، TMA، LAMP، RCA و غیره است. از دهه گذشته، با افزایش یافته های گروه های عفونت HBV سرولوژیکی منفی و ظهور جهش های تشخیصی، سنجش های DNA بر مبنای اسید نوکلئیک در زمینه بالینی اهمیت پیدا کرده اند. با پیشرفت فن آوری و کاهش هزینه ها، روش‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک به‌عنوان روش‌های تکمیلی یا تشخیصی تکمیلی یا جایگزین شده اند. علاوه بر این، روش‌های مبتنی بر اسید نوکلئیک در تعیین کمی سطح HBV DNA در بیماران، برای ارزیابی مرحله تکثیر و اثربخشی درمان ضد ویروسی بسیار مهم است؛ و در این تحقیق هدف ما طراحی و توسعه Dual-probe Real Time PCR جهت شناسایی کمی ویروس هپاتیت B بود که شناسایی کمی این ویروس در مراحل درمانی بیماران هپاتیت B بسیار مهم می‌باشد.

علاوه بر ژنوتیپ، تجزیه و تحلیل کمی عفونت HBV به طور گسترده ای برای نظارت بر پیشرفت بیماری و درمان آن استفاده می شود. در زمینه تشخیص کمی ویروس هپاتیت B تحقیقاتی توسط دیگر محققان صورت گرفته که در زیر به انها اشاره خواهیم کرد.

در سال ۱۹۹۳ میکو اووسی PCRکمی برای ویروس هپاتیتB با استفده از روش تشخیص رنگ سنجی را گسترش داد. در این تحقیق یک آزمایش رنگ سنجی حساس و جدید برای تعیین کمیت تعداد اولیه ژنوم ویروس هپاتیت (HBV) B که در PCR تکثیر شده است، توصیف شده است. ژنوم های ویروسی همراه با یک استاندارد داخلی برای تغییر ضریب کارایی تقویت می شوند. یکی از دو پرایمر بیوتینیله بود و مخلوط HBV و IS DNA برای تشخیص کمی به صفحات میکروتیتر کوت شده با استرپتاویدین متصل شدند. تشخیص رنگ سنجی کمی، سریع و دقیق با دامنه پویایی از حدود ۱۰ تا> ۱۰ مولکول DNA بود و تعداد اولیه ژنوم های HBV در یک نمونه بالینی از نسبت سیگنال HBV / IS با استفاده از یک منحنی استاندارد تفسیر می شود. در این روش ۱۵ ژنوم ویروسی از ۱۰ میکرولیتر سرم کمی سازی شد.

در سال ۲۰۰۱ سول یاتس و همکارانش تشخیص کمی DNA ویروس هپاتیت B با استفاده از روش Real-Time با پروب های Beacon را توسعه دادند. در این تحقیق انها یک سیستم شناسایی و کمی سازی DNA برای شناسایی ویروس هپاتیت

B (HBV) مبتنی بر NASBAو real-timeبا پروب های Beacon را ایجاد کردند. در این کار انها نشان دادند که با تغییراتی مانند طراحی پرایمر، روش استخراج نمونه و دناتوراسیون الگو، می‌توان روش NASBA را برای تکثیر DNA هدف و درنتیجه ایجاد آمپلیکن RNA مناسب کرد. یک مزیت عمده روش انها ماهیت ایزوترمال یک لوله ای است که اجازه می دهد برنامه ای با توان بالا برای تشخیص اسید نوکلئیک باشد. این روش دارای محدوده تشخیصی ۱۰۳ تا ۱۰۹ نسخه HBV DNA/ میلی لیتر از پلاسما یا سرم، با تکرارپذیری و دقت خوب است.

در سال ۲۰۰۶ میمونا مندی و همکارانش از real-time PCR برای تعیین کمیت DNA ویروس هپاتیت B در ناقلین مزمن در گامبیا استفاده کردند. سنجش کمی real-time PCR با استفاده از تشخیص سیگنال SYBR-Green و آغازگرهای اختصاصی برای ژن S انجام شد.HBV DNA شاخص قابل اعتماد تری از وجود ویروس نسبت به آنتی ژن HBe بود و در ۷۷٫۰٪ HBeAg منفی و در همه ناقلین HBeAg مثبت تشخیص داده شد.

در سال ۲۰۱۰ روبرتا سیتنیک و همکارانش از روش real-time برای تشخیص کمی ویروس هپاتیت ب برای شناسایی همه ژنوتیپ های HBV استفاده کردند. در این تحقیق انها از سنجش real-time PCR برای کمی سازی HBV DNA با تکنیک TaqMan و پروب های MGB استفاده کردند. آغازگرها و پروب ها با استفاده از ترازبندی و تنظیم توالی از همه ژنوتیپ های HBV به منظور تکثیر یکسان همه آنها طراحی شده بودند. روش انها کنترل داخلی بود و با یک پانل بین المللی HBV استاندارد شده بود؛ و مقادیر CV بدست آمده در این روش به ترتیب ۰٫۱۲ و ۰٫۰۹ بود. این روش برای تقویت همه ژنوتیپ های HBV کارآمد بوده و گزینه خوبی برای تعیین کمیت DNA HBV به‌عنوان یک روش معمول، با یک پروتکل ارزان و قابل اعتماد ارائه داد.

در سال ۲۰۱۴ الکیون دالیورا و همکارانش توسعه آزمایش real-time PCRمقرون به صرفه را برای شناسایی طیف گسترده ای از غلظت HBV DNA در منطقه آمازون غربی برزیل استفاده کردند. هدف از این مطالعه توسعه یک روش داخلی مبتنی بر real-time PCR بود، که هم بسیار حساس و هم کارآمد باشد و یک روش جایگزین برای آزمایش اسید نوکلئیک (NAT) ارائه دهد. در این تحقیق یک قطعه توالی پیش هسته به طول ۱۰۹ جفت باز کلون سازی و رقیق شد. از پلاسمید داخلی رقت های سریالی ۲ × ۱۰۳ تا ۲ × ۱۰۹ نسخه در میلی لیتر تهیه کردند. حد تشخیص برای سنجش با استانداردهای pHBVRO ۲۰۰۰ / میلی لیتر در حجم کل واکنش ۳۰ میکرولیتر بود. نتایج کار انها نشان داد که qHBVRO PCR می‌تواند HBV DNA را در افراد مبتلا به هپاتیت B در هر مرحله از بیماری نشان دهد که ظرفیت بالایی برای غربالگری NAT در اهدا کنندگان هپاتیت B را نشان می دهد.

نتایج تحقیقات بالا نشان داد تکنیک های مورد استفاده توسط این محققین به خوبی توانسته تشخیص کمی ویروس هپاتیت B را انجام دهند که همه انها با استفاده از تکنیک real-time PCR و طراحی پرایمرها و پروب های مناسب انجام شده اند. در تحقیقاتی که توسط ما انجام شد پرایمر ها و پروب ها و کالیبراتور مناسبی را برای تشخیص کمی توسط سیستم real-time PCR طراحی کردیم که کالیبراتوذ در ۳ رقت ۱۰۰،۱۰۰،۱۰۰۰۰ تهیه گردید و ۵ نمونه با این سیستم بررسی و با کیت Geneproof از نظر کارایی مقایسه شد و نتایج نشان داد که سیستم پرایمر و پروب طراحی شده با فرمت هیدرولیز کارایی خوب و مناسبی برای تشخیص کمی ویروس هپاتیت B دارد و همچنین طراحی و ساخت کالیبریتور و تبدیل عددی آن هم از صحت مناسبی برخوردار می‌باشد و می‌توان از این سیستم در شناسایی Viral Load در مراکز بالینی استفاده نمود که در مراحل درمان این بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است.

پیشنهادات

۱. استفاده از نمونه های سرمی بیشتر جهت بررسی سیسیتم طراحی شده ما و مقایسه ان با سایر کیت های موجود در بازار.

۲. سیستم طراحی شده به منظور چک کردن به سایر آزمایشگاه‌ها داده شود و نتایج ان در مقایسه با سایر کیت ها از طریق این مراکز اعلام شود.

منابع

1. Blumberg BS. Australia antigen and the biology of hepatitis B. Science 1977;197:17-25.
2. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. Ann Intern Med 1967;66:924-31.
3. Maccallum FO. Homologous serum hepatitis. Proc R Soc Med 1946;39:655-7.
4. . Eble BE, Lingappa VR, Ganem D. The N-terminal (pre-S2) domain of a hepatitis B virus surface glycoprotein is translocated across membranes by downstream signal sequences. J Virol 1990;64:1414-9.
5. Zlotnick A, Venkatakrishnan B, Tan Z, Lewellyn E, Turner W, Francis S. Core protein: a pleiotropic keystone in the HBV lifecycle. Antiviral Res 2015;121:82-93.
6. Mason WS, Seal G, Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. J Virol 1980;36:829-36.
7. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. Cell 1982;29:403-15.
8. Bartenschlager R, Schaller H. The amino-terminal domain of the hepadnaviral P-gene encodes the terminal protein (genome-linked protein) believed to prime reverse transcription. EMBO J 1988;7:4185-92.
9. Zoulim F, Seeger C. Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. J Virol 1994;68:6-13.
10. Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ. Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. Science 2001;294:2376-8.
11. 80. Melegari M, Scaglioni PP, Wands JR. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. Hepatology 1998;27:628-33.
12. Tang H, Delgermaa L, Huang F, Oishi N, Liu L, He F, Zhao L, Murakami S. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication. J Virol 2005;79:5548-56.
13. Leupin O, Bontron S, Schaeffer C, Strubin M. Hepatitis B virus X protein stimulates viral genome replication via a DDB1-dependent pathway distinct from that leading to cell death. J Virol 2005;79:4238-45.
14. . Clippinger AJ, Gearhart TL, Bouchard MJ. Hepatitis B virus X protein modulates apoptosis in primary rat hepatocytes by regulating both NF-kappaB and the mitochondrial permeability transition pore. J Virol 2009;83:4718-31.
15. Hsieh A, Kim HS, Lim SO, Yu DY, Jung G. Hepatitis B viral X protein interacts with tumor suppressor adenomatous polyposis coli to activate Wnt/β-catenin signaling. Cancer Lett 2011;300:162-72.

16. Iyer S, Groopman JD. Interaction of mutant hepatitis B X protein with p53 tumor suppressor protein affects both transcription and cell survival. Mol Carcinog 2011;50:972-80.
17. Rivière L, Gerossier L, Ducroux A, Dion S, Deng Q, Michel ML, Buendia MA, Hantz O, Neuveut C. HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. J Hepatol 2015;63:1093-102.
18. Jeong JK, Yoon GS, Ryu WS. Evidence that the 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA. J Virol 2000;74:5502-8.
19. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. World J Gastroenterol 2007;13:65-73.
20. Summers J, Smolec JM, Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. Proc Natl Acad Sci U S A 1978;75:4533-7.
21. Lenhoff RJ, Luscombe CA, Summers J. Acute liver injury following infection with a cytopathic strain of duck hepatitis B virus. Hepatology 1999;29:563-71.