

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 نیان****

بیبا سیفی*****

چکیده:

سایتو کاینها 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 سایتو کاینها 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 سایتو کاینهای 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 سایتو کاینها 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 ماکزیمم بیان ژن می تواند در مطالعات کلونینگ و استعداد ابتلا به بیماریها در بعضی از افراد کاربرد داشته باشد.

بعد از کشت لئوسیتها در حضور PHA (Phytohaemagglutinin) (با غلظت $1\mu\text{g}/10^6\text{cell}$) در زمانهای متفاوت (۰، ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، 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 cDNA حاصل با ضریب رقت ۱/۲ (رقتهای متوالی ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، و...) شد. بر روی ژل الکتروفورز (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 لئوسیتها با PHA، بیشترین بیان ژن را دارند (تیتراسیون cDNA=512) و معمولاً بعد از گذشت ۲۴ 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 سایتو کاینهاست 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 اینترفرون گاما زمان ایده آلی است.

کلید واژه ها: اینترفرون گاما / لئوسیتهای فعال شده با PHA / واکنش زنجیره پلیمرز

* استادیار گروه ایمنولوژی مرکز تحقیقات ایمنولوژی 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

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، میتوزن و یا قسمتهای ناشناخته میکروبهها) 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 I (114bp)، II (69bp)، III (183bp) و IV (135bp) است که توسط سه اینترون A (1239bp)، B (95bp) و C (2425bp) 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 CD₂ سطح لنفوسیتها و تجمع آنها در نقطه ای از سطح سلول، عبارت دیگر PHA در اینجا عمل آنتی ژن را تقلید می کند ۲- از مسیری جدا از TCR و با خاصیت میتوزنی خود به گیرنده های میتوزنی سطح سلول T متصل شده و آنها را فعال می کند (۳-۵).

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 تستهای چون الیزا و رادیوایمنواسی سنجیده می شود (۷).

۳- امروزه بیشتر از روشهایی 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 AUUUA در 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 ویروسهای مثل M-Mulv و AMV ملکول mRNA به cDNA تبدیل شود و سپس PCR معمولی انجام شود (۱۰).

ب- RT-PCR: Quantitative-RT-PCR کمی جهت برآورد میزان DNA یا RNA موجود در یک محلول بکار می رود (۱۱-۱۳). یکی از روشهای ساده جهت انجام RT-PCR کمی ایجاد رقت سریال از DNA یا cDNA اولیه است و سپس انجام PCR با هر یک از این رقت هاست. آخرین رقتی که باند قابل رویت ایجاد کرد بعنوان تیتراژ مورد نظر سنجیده می شود. مثلاً اگر آخرین رقت ۱/۵۱۲ باشد تیتراژ آن ۵۱۲ در نظر گرفته می شود و نشان می دهد مقدار cDNA اولیه آن خیلی بیشتر از cDNA اولیه تیتراژ ۱۶ است (۱۴، ۱۰-۱۶). عموماً چون اکثر "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 لذا می 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

(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 ۱X)، $RNase\ inhibitor(40\ u/20\ \mu l)$ 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، cDNA تولید شده در ۲۰- درجه قرار گرفت.

PCR: هر محلول PCR (کوکتل) بمقدار ۲۰ میکرولیتر شامل: $dNTPmix$ ، $MgCl_2(2mM)$ ، $Tris(pH=8\ in\ 20^{\circ}C)$ (0.8mM)، $dATP, dTTP, dGTP, dCTP$ هر کدام با غلظت $(0.2mM)$ ، $Taq\ DNA\ polymerase\ (0.5\ u/20\ \mu l)$ ، cDNA (2 μl) 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: $94^{\circ}C\ 5\ min$), (40cycles: $94^{\circ}C\ 45sec$, $55^{\circ}C\ 1\ min$, $72^{\circ}C\ 1\ min$)(end cycle: $72^{\circ}C\ 5\ min$)

بود. بعد از اتمام کار جهت افزایش محلول لوله های اپندورف سانتریفوژ شد.

Semi-Quantitative-PCR: ممکن است حین استخراج، مقادیر متفاوتی از RNA 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

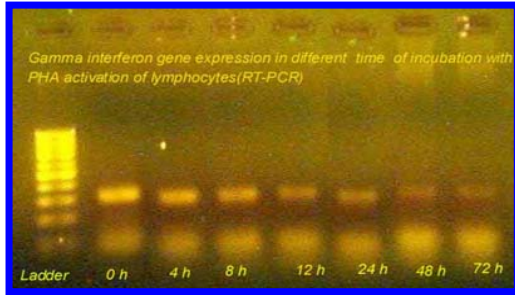
می تواند در مطالعات اثر عوامل مختلف مثل ویروسها، داروها... بر بیان اینترفرون گاما در محیط کشت مفید باشد. بعلاوه در کلونینگ و بیان ژن اینترفرون در سلولهای یوکاریوت کاربرد زیادی داشته باشد.

روش کار:

جداسازی لنفوسیت های 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 (۱ به 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 RPMI₁₆₄₀ کامل (حاوی 20% FCs, 100 $u/ml\ penicillin\ G$ و $100\ \mu/ml\ Streptomycin$) و ۳۰۰ میکرولیتر محلول PHA (با غلظت $10\ \mu g/ml$) 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).

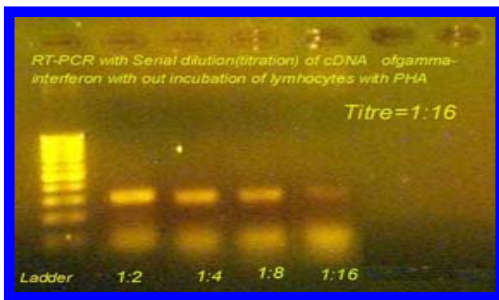
استخراج Total RNA و سنتز cDNA تک رشته ای: بعد از سپری شدن زمانهای انکوباسیون، سلولها سانتریفوژ شده و محیط روئی سلولها دور ریخته شد. سلولها دو بار توسط محلول هنکس شستشو داده شدند (شستشو زیاد mRNA را تخریب می کند). پلت حاصل از سلولها را با ۱ میلی لیتر از محلول Trizol همراه کرده و ۲۰ میکرولیتر کلروفورم بدان اضافه شد. این دو محلول باعث دناتور شدن سلولها و آزاد شدن RNA، DNA و پروتئینها می شود. سانتریفوژ محلول فوق در دور ۱۴۰۰۰ دو فاز تشکیل می دهد. فاز بالائی (فاز آبی) حاوی RNA و فاز پایینی (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

۲- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات RT-PCR بدست آمده از لنفوسیت‌هایی 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).

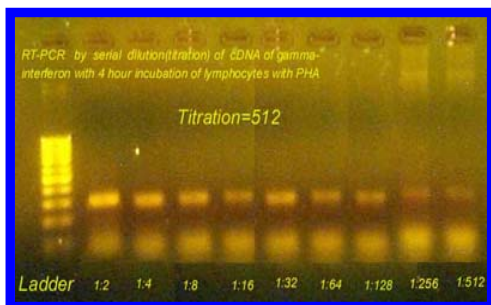


شکل ۲: الگوی الکتروفورزی محصولات PCR از ساعات مختلف انکوباسیون (بدون تهیه رقت)

۳- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات RT-PCR از لنفوسیت‌هایی که مدت زمان‌های مختلف با PHA انکوبه شده اند به تفکیک ساعات انکوباسیون مختلف و تهیه رقت سریال (با ضریب رقت ۱/۲) از cDNA نشان می دهد که بیشترین بیان ژن را در ۴ ساعت انکوباسیون با تیترا ۵۱۲ داشته ایم. تیترا ساعات مختلف بترتیب 0h=16 (شکل 3a)، 4h=512 (شکل 3b)، 8h=64 (شکل 3c)، 12h=64 (شکل 3d)، 24h=64 (شکل 3e)، 48h=32 (شکل 3f) و 72h=16 (شکل 3g) است.



3a-without incubation



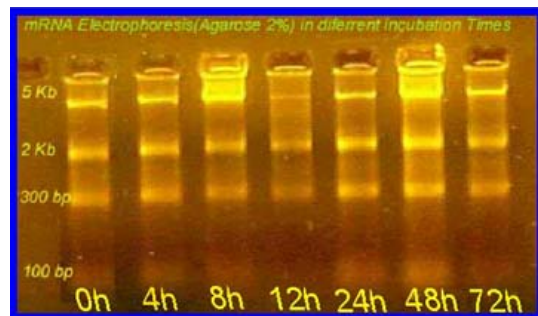
3b- 4h incubation

(1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, ...). برای هریک از این رقتها در اپندورف جداگانه ای PCR انجام شد. در نهایت تیترا نهائی از cDNA که می توانست باند قابل رویت در ژل ۲٪ ایجاد کند بعنوان تیترا بدست آمده برای آن انکوباسیون لنفوسیت در نظر گرفته شد (۲۱، ۲۰، ۱۳).
ژل الکتروفورز: مقدار ۵ میکرولیتر از محصول PCR با یک میکرولیتر از بافر نمونه (6x buffer: 0.25% Bromophenol, 0.25% xylene cyanol, 15% ficoll₄₀₀) ۲٪ بارگذاری شد. جهت تهیه ژل آگاروز از بافر TAE (0.05% Tris glacial acetic acid and EDTA, PH=8) 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.

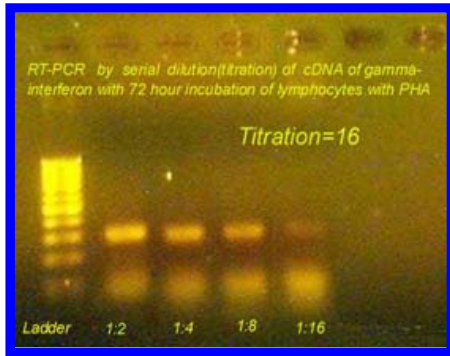
نتایج :

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 باندها بترتیب نشان دهنده RNA های 5 S، 18 S، 28 S و tRNA سلولهای یوکاریوتی است. اکثر mRNA ها باید در ناحیه 5 S و 18 S باشند (شکل ۱).

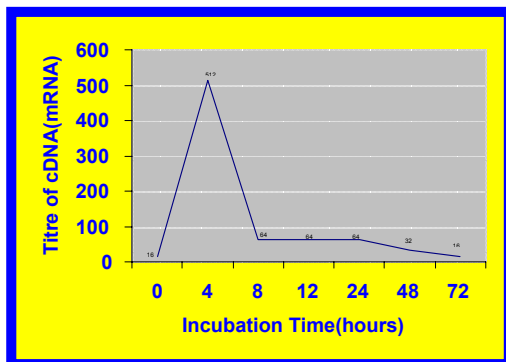


شکل ۱: الگوی الکتروفورزی RNA توتال استخراج شده در ساعات مختلف انکوباسیون



3g-72h incubation

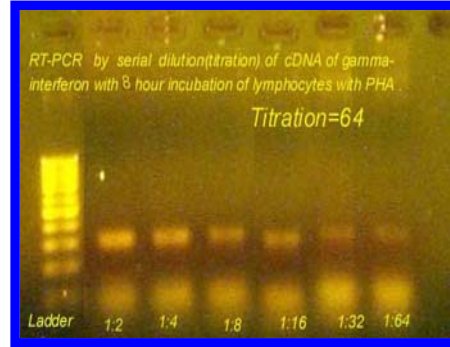
۴- مدتی بعد از افزودن PHA به محیط کشت، لنفوسیتها فعال شده و شروع به بیان ژن اینترفرون می کنند که بالاترین بیان ژن (مقدار mRNA) بعد از گذشت ۴ ساعت از فعال سازی است و سریعاً مقدار آن بحالت طبیعی بر می گردد(نمودار ۱).



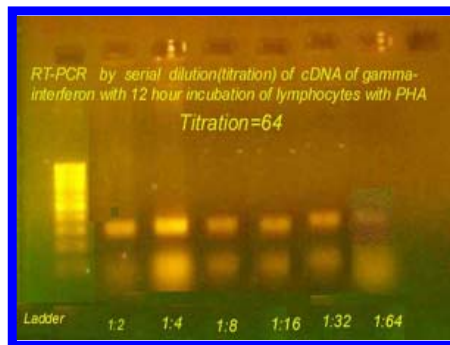
نمودار ۱: تغییرات میزان بیان mRNA ژن اینترفرون گاما در لنفوسیتها برحسب زمان انکوباسیون با PHA

بحث:

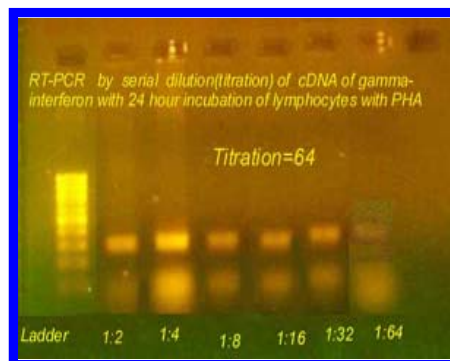
همانطور که ملاحظه شد ژن اینترفرون در یک محدوده وسیعی در حضور PHA بیان شده است. حتی بدون انکوباسیون با PHA هم mRNA این ژن با استفاده از روش RT-PCR قابل اندازه گیری است. ۴ ساعت تحریک لنفوسیتها با PHA کافی است تا مقدار mRNA سلول را به بالاترین حد خود یعنی تیترا ۵۱۲ برساند. بخاطر ناپایدار بودن mRNA این تیترا سریعاً کاهش یافته و به مقدار ۶۴ می رسد. ولی هنوز تقریباً ۲۲ ساعت وقت لازم دارد به سطح اولیه قبل از تحریک یعنی تیترا ۱۶ برسد. چونکه وجود تحریک مداوم توسط PHA در محیط کشت باعث شده است تا بیان مختصری از ژن را



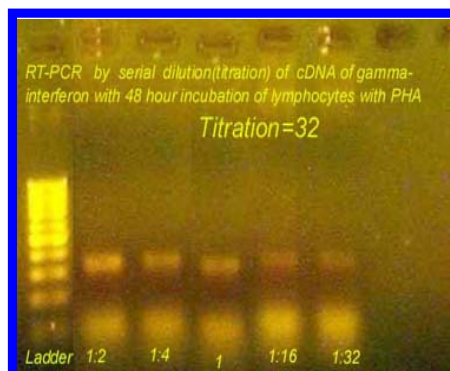
3c- 8h incubation



3d-12h incubation



3e-24h incubation



3f-48h incubation

- 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, omniscrypt and sensiscrypt 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):

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 تیتراژ 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 شناسایی 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 نموده اند (۱۸-۱۴).

منابع :

1. Abbas A K, Lichtman 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.

- 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 coinfectd with human immunodeficiency virus and leishmania infantum. *Am J Trop Med Hyg* 1999 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. *Psychoneuroendocrinology* 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.