

طراحی و استفاده از روش Visual DNA Chip برای تشخیص عفونت ویروس نقص ایمنی اکتسابی (HIV-1)

جواد دوزنده^۱، مهرداد روانشاد^{۲*}، منوچهر رسولی^۳، فرزانه صباحی^۴، عبدالوهاب البرزی^۵

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- مربی، گروه ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات بالینی میکروب شناسی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
- ۴- دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- استاد، مرکز تحقیقات بالینی میکروب شناسی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

پذیرش مقاله: ۸۶/۹/۱۹

دریافت مقاله: ۸۶/۳/۲۹

چکیده

هدف: ویروس نقص ایمنی اکتسابی نوع یک (HIV-1)، عامل ایجاد کننده نشانگان نقص ایمنی اکتسابی انسانی (AIDS) می باشد و تشخیص ژن ویروس HIV-1 در نمونه های مشکوک مدرکی جهت تشخیص عفونت است. انتقال بیماری از طریق انتقال خون در دوره پنجره در مراکز انتقال خون، یک معضل جهانی محسوب می شود. علاوه بر این، نیاز مبرمی برای تشخیص سریع، حساس و دقیق عفونت HIV-1 قبل از ظهور پادتن در بدن فرد آلوده در بیمارستان ها، مراکز بهداشتی و در نوزادان متولد شده از مادران آلوده وجود دارد.

مواد و روش ها: روش سریع و حساس تراشه ویژوال DNA با کمک RT-Nested PCR و روش و سیستم نشانگر آنزیم- سوبسترا بکار گرفته شد. در ابتدا پس از طراحی و راه اندازی روش RT-Nested PCR و اطمینان از به دست آمدن محصول مورد نظر، با استفاده از dNTP نشان دار شده و با ماده دیگوكسی ژنیم، روش یاد شده طراحی گردید. محصول به دست آمده بر روی تراشه، که از قبل مراحل آماده سازی آن انجام شده و کاوشگر به آن متصل گردیده بود، تحت شرایط هیبریداسیون قرار گرفت. پس از شستشوی تراشه، با آنتی بادی ضد دیگوكسی ژنیم که با آنزیم آلکالین فسفاتاز، کونژوگه شده بود نزدیک کرده و پس از شستشو، در حضور سوبسترای BCIP/NBT واکنش انجام گرفت. تولید رنگ ارغوانی، نشانه بر مثبت بودن آزمایش و حضور ژن ویروس در آن نمونه می باشد و عدم تغییر رنگ مبنی بر منفی بودن آزمایش است.

نتایج: ۳۵ نمونه سرمی از مراحل مختلف عفونت (ایدز، علامت دار و بدون علامت) و ۲۰ نمونه سرمی تأیید شده منفی، جمع آوری شد و با روش یاد شده مورد بررسی قرار گرفت. در تمام موارد مثبت رنگ ارغوانی مشاهده گردید، ضمن اینکه در هیچ کدام از موارد منفی رنگی مشاهده نشد.

نتیجه گیری: در این پژوهش، مشاهده گردید روش طراحی شده، دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی برای تشخیص عفونت ویروس HIV-1 می باشد. به نظر می رسد که ژن ویروس را می توان حتی قبل از تغییرات سرمی و ظهور پادتن تشخیص داد و از این رو می توان دوره پنجره ای عفونت را کوتاه تر کرد. علاوه بر آن در نوزادان متولد شده از مادران آلوده به دلیل انتقال مادری پادتن ها روش های تشخیص پادتن و سرولوژی فاقد ارزش است و بنابراین از این شیوه می توان استفاده نمود. همچنین در این روش به دلیل حساسیت بالا، نمونه های سرمی مثبت با بار ویروسی خیلی پایین هم قابل تشخیص است.

کلیدواژگان: HIV، RT-Nested PCR، Visual DNA Chip

۱- مقدمه

امروزه ویروس نقص ایمنی اکتسابی نوع یک (Human Immunodeficiency virus Type-1: HIV-1) تبدیل به یکی از مهمترین معضلات بهداشتی دنیا شده است. شیوع فزاینده این ویروس در سال‌های اخیر و گسترش آن در کشورهای در حال توسعه و ارتباط مستقیم و غیر مستقیم آن با فقر، اعتیاد، فساد، و فحشا، آن را تبدیل به یک معضل بهداشتی، اجتماعی و سیاسی کرده است که این امر باعث شده نه تنها محققان و پژوهشگران علم پزشکی به دنبال راهی برای برون رفت از این معضل باشند، بلکه تلاشگران عرصه‌های اجتماعی و سیاستمداران را هم به تکاپو واداشته است تا به نوعی جامعه را از خطرات این بیماری خانمان برانداز آگاه کرده و راهی برای توقف و کنترل این بیماری پیدا کنند [۲۰۱]. اگر چه هنوز درمان قطعی و یا واکسنی برای این بیماری طراحی نشده است، ولی تشخیص این بیماری در مراحل اولیه می‌تواند راه را برای شروع یک ساز کار دفاعی مناسب هموار سازد که باعث طولانی‌تر شدن عمر این بیماران و همچنین مانع از انتقال آن به افراد مستعد سالم شود. از این رو در حال حاضر تشخیص سریع بیماری در مراحل اولیه یک هدف عمده برای اکثر پژوهشگران و مراکز تحقیقاتی معتبر در این عرصه می‌باشد [۱-۳].

امروزه روش‌های متعددی برای تشخیص این بیماری بکار گرفته می‌شود. متداول‌ترین روش جهت تشخیص این ویروس، استفاده از روش‌های سرولوژیک رایج و تشخیص پادتن اختصاصی، مانند روش الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA) برای غربالگری و وسترن بلات به منظور تأیید عفونت می‌باشد [۴، ۵].

گرچه این روش‌ها از قدرت تشخیصی بالایی برخوردار هستند، اما با توجه به گسترش سریع بیماری و با علم به اینکه ارزیابی‌های تشخیصی پادتن در الایزا دارای دوره پنجره

(Window period) می‌باشد، لازم است تا شیوه‌ای بکار برده شود که هم بتواند دوره پنجره را کوتاه‌تر کند و هم قادر باشد مقادیر بسیار کم از ژن ویروس را که جهت طرح‌های درمانی از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است، تشخیص دهد. از روش‌هایی که در سال‌های اخیر از آن استفاده فراوانی می‌شود، روش تراشه DNA می‌باشد [۶، ۷].

در این پژوهش روشی بکار گرفته شده است که می‌تواند از فناوری پیشرفته و قدرتمند تراشه DNA استفاده نماید، افزون بر این، با توجه به حذف لوازم و دستگاه‌های گران قیمت، می‌تواند در آینده در مراکز تشخیصی بالینی و پژوهشی از این شیوه استفاده کرد. ضمن اینکه روش حاضر دارای حساسیت بالایی نیز می‌باشد، به طوری که قادر است میزان ژن ویروسی، حتی تا یک پیکوگرم، را نیز تشخیص دهد و به این ترتیب دوران پنجره عفونت را که هنوز پادتن‌ها ساخته نشده‌اند و در طی آن عفونت قابلیت انتقال دارد، کوتاه‌تر کند [۸، ۹].

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- طراحی آغازگر (Primer)

مطالعه‌های انجام گرفته و با توجه به ثابت بودن توالی ژن gag در بین ایزوله‌های مختلف ویروس HIV، ژن یاد شده انتخاب و توالی مربوط از بانک ژن به دست آمد. آغازگرهای خارجی و داخلی تکثیر کننده قطعه مورد نظر و کاوشگر، با استفاده از نرم افزار طراحی آغازگر Gene Runner طراحی و انتخاب شد تا برای روش Nested PCR مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر آن، یک کاوشگر اختصاصی به منظور تشخیص محصول مورد نظر در سطح تراشه، طراحی و برای انتهای توالی کاوشگر، در ناحیه ۵' ده نوکلئوتید تیمین و مولکول بیوتین (Biotin) طراحی گردید (جدول ۱). سپس با استفاده از این آغازگرها و با توجه به محل اتصال آنها، طول قطعه تکثیر یافته برای دور اول ۳۳۰ جفت باز و برای دور دوم، ۲۴۹ جفت باز بدست آمد.

جدول ۱ توالی دو جفت آغازگرهای خارجی، داخلی و کاوشگر برای تشخیص ویروس HIV-1

F ₁	GAG AGA TGG GTG CGA GAG CGT CAG T	25n
R ₁	TGT TTT GCT CTT CCT CTA TCT TGT C	25n
F ₂	TGG GAG AGC GTC AGT ATT	18n
R ₂	AGG GTT GCT ACT GTA TTA T	19n
کاوشگر	TTTTTTTTTTTTGCGAGAGCGTCAGTATT	28n

۲-۲- آماده سازی تراشه DNA

اسلایدهای موسوم به تراشه سوپر استرپ‌آویدین (Super Streptavidin Chip) از شرکت Arrayit آمریکا، که در سطح خود دارای استرپ‌آویدین (Streptavidin) می‌باشند، خریداری و تا زمان استفاده در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. به هنگام استفاده، کاوشگر نشان‌دار شده با مولکول بیوتین (که در قسمت ۵ آن متصل شده است) را با استفاده از بافر $500 \text{ mM NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ (pH=9) در سطح اسلایدها ریخته شد؛ سپس آن را به یک محفظه کوچک دردار حاوی مختصری رطوبت منتقل کرده که ۱۲ تا ۱۶ ساعت در آن نگهداری گردید. پس از آن اسلایدها را با بافر شستشو [TNT (Tris-NaCl-Tween 20 buffer) pH=7/5] شسته و برای مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳- جمع‌آوری نمونه، استخراج RNA ویروسی

و مرحله رونویسی معکوس

نمونه‌های سرمی HIV-1 مثبت از بیمارستان امام خمینی تهران و بانک نمونه‌های انستیتو پاستور ایران از بیماران مبتلا به ایدز، دارای علامت و بدون علامت تهیه شد. ۱۴۰ میکرولیتر از سرم برای استخراج RNA ویروسی استفاده و بقیه به فریزر -۷۰ درجه سانتیگراد منتقل شد. استخراج به وسیله کیت استخراج RNA ویروسی (QiagenTM) انجام گرفت. RNA استخراج شده بلافاصله به منظور انجام مرحله رونویسی معکوس بکار برده شد.

در ابتدا ۵ میکرولیتر RNA ویروسی به همراه ۶ میکرولیتر آب مقطر، دویار تقطیر و ۱ میکرولیتر آغازگر اختصاصی آنتی سنس (Antisense) (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار) در یک لوله اپندورف (Eppendorf) وارد کرده سپس به دستگاه ترموسایکلر (Master cycler gradient, Eppendorf) انتقال داده و به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد؛ در مرحله بعد با اضافه کردن ۴ میکرولیتر بافر آنزیم RT (Reverse Transcriptase) (FermentasTM)، ۲۰ واحد RNasin آنزیم RT (FermentasTM) ۲۰ واحد آنزیم دی‌اکسی نوکلئوتید (dATP, dTTP, dCTP, dGTP, Cinnagen) به همراه یک میکرولیتر $1/5 \text{ MgCl}_2$ میلی‌مولار، حجم نهایی را به ۲۰ میکرولیتر رسانیده و به دستگاه ترموسایکلر منتقل گردید و در این مدت پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و یک ساعت در ۴۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت. با پایان یافتن زمان واکنش، cDNA ساخته شده، به‌عنوان الگویی برای مرحله بعد استفاده گردید.

۲-۴- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

دور اول PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی بافر ۱X PCR و ۲ میلی‌مولار MgCl_2 به همراه ۲ میکرولیتر از cDNA به‌عنوان الگو، ۱/۲۵ میکرولیتر از آغازگرهای (۱۰ میلی‌مولار) JDR1, JDF1، مخلوط dNTPs ۰/۲۲ میلی‌مولار، یک واحد آنزیم Taq پلیمرز (Cinnagen) و در نهایت یک قطره روغن معدنی به سطح آن اضافه کرده و در دستگاه ترموسایکلر تحت شرایط ذیل منتقل گردید:

۳۰ ثانیه، ۴۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد برای مرحله طولی سازی نهایی.

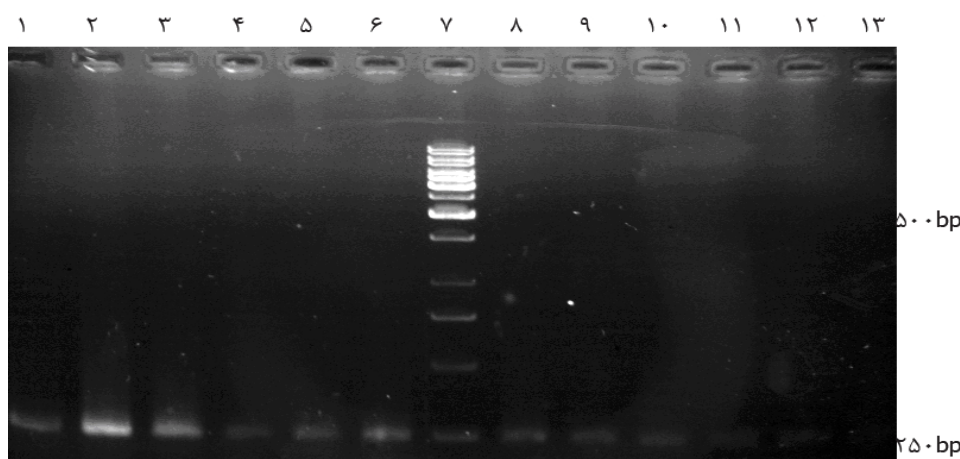
۲-۵- ژل الکتروفورز

۱۰ میکرولیتر از محصول دور دوم را با یک میکرولیتر از بافر نمونه‌گذاری ۶X (Fermentas™)، مخلوط کرده و روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) برده شد. پس از آن، ژل به تانک حاوی بافر ۱X TBE (Tris-borate-EDTA) منتقل گردید و به مدت یک ساعت در ولتاژ ۸۰ ولت قرار گرفت. با پایان یافتن زمان واکنش ژل را به دستگاه ترانس ایلومیناتور (Transilluminator) انتقال داده و با اشعه ماورای بنفش (Ultraviolet: UV) مشاهده و تصویر آن ثبت گردید (شکل ۱).

۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه: ۹۴ درجه به مدت ۳۵ ثانیه، ۵۴ درجه به مدت ۳۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۵ ثانیه و سرانجام یک مرحله طولی سازی (Elongation) نهایی به مدت ۵ دقیقه. پس از پایان زمان واکنش، محصولات دور اول را به میزان $\frac{1}{64}$ رقیق کرده و به عنوان الگویی برای دور دوم استفاده گردید. مواد و شرایط دور دوم به قرار زیر است:

بافر ۱/۱۵X PCR، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۲ میکرولیتر از محصول رقیق شده دور اول، ۱/۲۵ میکرولیتر از آغازگرهای (۱۰ میلی مولار) JDR2, JDF2، مخلوط dNTPs ۰/۲ میلی مولار و به همراه یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase را در یک لوله ۲۰۰ میکرولیتری اپندورف، مخلوط کرده، یک قطره روغن معدنی به سطح آن اضافه گردید، سپس دور دوم با برنامه ذیل ادامه داده شد:

۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه: ۹۴ درجه به مدت



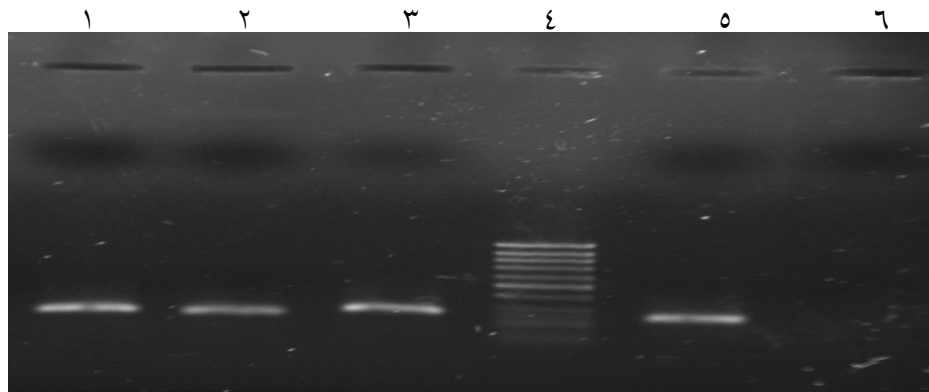
شکل ۱ مربوط به محصول واکنش Nested PCR

چاهک ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۸ و ۹: نمونه‌های مثبت قابل تشخیص با روش Nested PCR؛ چاهک ۷: نشانگر وزنی DNA (Ladder Mix، شرکت Fermentas)؛ چاهک ۴، ۱۰، ۱۱ و ۱۲: نمونه‌های مثبت غیر قابل تشخیص با روش Nested PCR؛ چاهک ۱۳: کنترل منفی

استفاده شد و مجدداً همان شرایط پیشین تکرار گردید. در این مرحله محصولی، که در انتهای واکنش به دست آمد، از دیگوکسی ژنین هم در ساختمان آن بهره گرفته شده است. از نمونه به دست آمده هم به وسیله دستگاه ژل داک تصویر مشاهده و ثبت گردید (شکل ۲).

۲-۶- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با dNTPs نشان‌دار شده با دیگوکسی ژنین

پس از اطمینان از حصول جواب مورد نظر و مشاهده باند مورد نظر روی ژل آگارز، برای انجام ادامه واکنش از مخلوط dNTPs حاوی دیگوکسی ژنین (Digoxigenin-11-dUTP)



شکل ۲ مربوط به محصول نهایی واکنش PCR در دور دوم با استفاده از dNTP نشاندار چاهک‌های ۱-۳: نمونه‌های بیماران با استفاده از dNTP نشاندار؛ چاهک ۴: نشانگر وزنی DNA (Low Range Plus، شرکت Fermentas)، چاهک ۵: کنترل مثبت؛ چاهک ۶: کنترل منفی

زاید از سطح آن برداشته شود. سپس به کمک ۵ میلی‌لیتر بافر متوقف کننده (Blocking buffer)، نواحی واکنش دهنده سطح اسلاید پوشانده شد تا از اتصالات غیر اختصاصی جلوگیری به عمل آید. پس از آن نیم میلی‌لیتر از پادتن کونژوگه (Conjugated) با آنزیم آلکالین فسفاتاز (Alkaline phosphatase) اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه تراشه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از آن دو بار و هر بار به میزان ۱۰ میلی‌لیتر در بافر شستشو غوطه‌ور گردید و بلافاصله سوبسترای BCIP/NBT (Substrate) (Bromo Chloro Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium chloride) به آنها اضافه شد. ضمناً واکنش ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انجام گرفت. رنگ ارغوانی ایجاد شده بعد از زمان، بیانگر مثبت شدن واکنش و حضور ژن ویروسی می‌باشد و عدم وجود واکنش رنگی، نشان‌دهنده منفی بودن و عدم حضور ژن ویروس می‌باشد.

۳- نتایج

به منظور راه‌اندازی روش تراشه ویژوال DNA (Visual DNA)، ابتدا روش RT-Nested PCR طراحی و راه‌اندازی گردید و پس از مراحل بهینه‌سازی، باند واضح قابل انتظار بروی ژل آگارز مشاهده گردید (شکل ۱). در مرحله بعد لازم بود با کمک dNTP نشان‌دار، روش مجدداً بهینه‌سازی گردد که باند مربوطه پس از انجام این عمل بر روی ژل آگارز مشاهده گردید (شکل ۲).

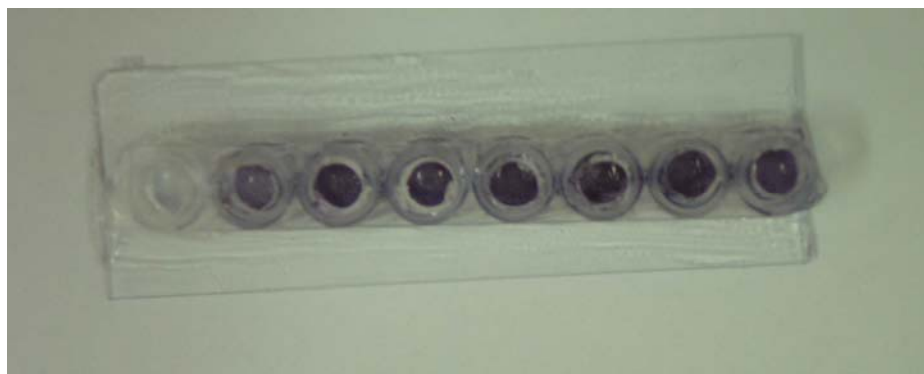
۲-۷- مرحله هیبریداسیون (Hybridization)

پس از اطمینان از تولید محصول حاوی دیگوکسی‌ژنین و همچنین دیدن قطعه مورد نظر روی ژل آگارز، برای نزدیکی با تراشه DNA آماده شد. برای این منظور محصول به دست آمده به نسبت یک دهم با کمک بافر رقیق کننده [۱۰۰ میلی‌مولار مالتیک اسید، ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl و pH=۷/۵ در حضور ۱٪ (Bovine Serum Albumin) BSA] رقیق شده را به همراه بافر هیبریداسیون (شامل ۴۰ میلی‌مولار PIPES [Piperazine-N,N'-bis (2-ethanesulfonic acid)] و ۱ میلی‌مولار EDTA (Ethylene Dinitro Tetra acetic Acid) و pH=۶/۸) مخلوط کرده و در ادامه به دستگاه ترموسایکلر اپندورف و به داخل کاست ویژه هیبریداسیون انتقال داده شد. سپس برنامه مورد نظر، را که شامل یک مرحله ۹۴ درجه به مدت پنج دقیقه به منظور واسرشت شدن و یک مرحله ۶۲ درجه (محاسبه شده از طریق نرم افزار) به مدت یک دقیقه برای انجام هیبریداسیون اعمال شد. لازم به توضیح می‌باشد که کلیه مراحل روش هیبریداسیون با کمک شیب غلظت مواد شرکت دهنده بهینه‌سازی گردید.

۲-۸- مرحله آشکارسازی

با اتمام زمان واکنش، تراشه را از دستگاه خارج کرده و در وان مخصوص اسلاید قرار داده شد و با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر بافر شستشو (TNT buffer) شسته تا مواد و اجزای

استفاده گردید. در حالی که در تمام نمونه‌های سرمی مثبت بررسی شده، واکنش رنگی به وضوح مشاهده گردید؛ با این حال، در هیچکدام از نمونه‌های کنترل منفی، واکنشی دیده نشد (شکل ۳).



شکل ۳ نتایج به دست آمده با روش تراشه ویژوال DNA

روش طراحی شده بر روی ۷۰ نمونه HIV-1 مثبت در مراحل مختلف بیماری شامل ایدز، با علامت و بدون علامت و همچنین ۱۵ نمونه پانل استاندارد تهیه شده از بانک نمونه انستیتو پاستور ایران، انجام شد. علاوه بر آن، اثبات کارایی روش از ۲۰ نمونه سرم منفی تأیید شده، به عنوان کنترل منفی

ارزیابی گردید و مشخص شد که روش تراشه ویژوال DNA طراحی شده، دارای حداقل ۱۰ برابر حساسیت بالاتری نسبت به روش RT-Nested PCR معمول دارد.

۴- بحث

به نظر می‌رسد روش تراشه ویژوال DNA از حساسیت و ویژگی بسیار بالا و قابل قبولی برخوردار می‌باشد [۱۰-۱۲]. تمام نمونه‌های سرمی مثبت که قبلاً تأیید شده بودند و یا نمونه‌های پانل استاندارد در این واکنش هم به نتیجه رسیدند که نشان از موفقیت آمیز بودن این روش می‌باشد. نکته‌ای که باعث بالا رفتن حساسیت روش می‌شود این است که در مرحله Nested PCR چنانچه به‌طور اتفاقی تکثیر اشتباهی صورت بگیرد، در مرحله دوم واکنش PCR انجام نخواهد شد؛ چون که آغازگرهای مرحله دوم برای توالی از همان محصول بار اول طراحی شده‌اند [۱۳]. همچنین کاوشگر استفاده شده در مرحله بعدی هم برای توالی از محصول مرحله دوم طراحی شده است. این مراحل سه‌گانه تکمیلی به همراه حساسیت بالای آنزیم و پادتن باعث می‌شود که این

بهینه‌سازی روش و همچنین انجام کنترل‌های مختلف در طی فرایند نقش بسزایی در کارایی روش طراحی شده دارد؛ بنابراین با استفاده از روش‌های گوناگون؛ نظیر چکر بورد (Checker Board) و رقت‌های متفاوت $MgCl_2$ و KCl ، روش، بهینه‌سازی گردید تا حساسیت این شیوه به میزان قابل قبولی افزایش یابد. براساس نتایج به دست آمده از پانل استاندارد و همچنین رقیق سازی نمونه‌ها، مشخص گردید که روش طراحی شده، توانایی شناسایی نمونه‌هایی که حداقل دارای ۵۰ کپی ژن ویروس در هر میلی‌لیتر باشد، دارا می‌باشد. برای بررسی تکرارپذیری روش طراحی شده، یک نمونه از پانل استاندارد که به صورت دوز بالا واکنش ایجاد می‌کند، ۸ بار به شکل جداگانه و به صورت تکراری مورد بررسی قرار گرفت (درون سنجش: Intra-assay). علاوه بر آن، ۳ نمونه مختلف سرمی هر کدام ۸ مرتبه به صورت مجزا مورد ارزیابی قرار گرفتند (بین سنجش: Inter-assay) و نتایج به دست آمده با کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۰ تجزیه تحلیل شد. علاوه بر نتایج به دست آمده با روش طراحی شده، محصول شیوه RT-Nested PCR نیز با کمک الکتروفورز بر روی ژل آگارز

برخوردار می‌باشد [۳،۱]. یکی از مشکلات، تشخیص صحیح و دقیق بیماری و همچنین در مرحله پنجره (که میزان بار ویروس بسیار کم است) می‌باشد [۳،۲]. علاوه بر آن، تشخیص بیماری در نوزادان متولد شده از مادران آلوده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. به این ترتیب این روش می‌تواند عفونت ویروسی را در زمانی که پادتن اختصاصی تولید نشده است و پادتن مادر از طریق جفت منتقل می‌گردد و منجر به نتایج کاذب می‌شود، را شناسایی کند و وجود ویروس و عفونت را اثبات کند [۱۳،۸]. با توجه به افزایش حساسیت روش طراحی شده نسبت به روش RT-Nested PCR معمول، به نظر می‌رسد که روش طراحی شده توانایی شناسایی ویروس در بخشی از دوران پنجره را دارد و بنابراین این دوره احتمالاً کوتاه‌تر می‌گردد.

روش از حساسیت و ویژگی بسیار بالایی برخوردار شود. حساسیت آنزیم آلکالین فسفاتاز بسیار بالاست و قادر به واکنش حتی در مقادیر خیلی کم سوبسترا می‌باشد؛ همچنین می‌تواند ژن ویروسی تا مقادیر یک پیکوگرم را شناسایی کند [۱۵،۱۴]. علاوه بر این، با توجه به اینکه روش استفاده از ژل برای تشخیص محصولات PCR دارای حساسیت کمتری نسبت به روش طراحی شده می‌باشد [۱۶،۹]، در مواردی که تعداد ژن ویروسی بسیار اندک باشد، تشخیص دقیق با موفقیت انجام می‌پذیرد [۱۶]. علاوه بر نتایج حاصل، روش طراحی شده قادر بود نمونه‌هایی را که حداقل ده بار رقیق شده بود با موفقیت شناسایی کند.

HIV از عوامل عفونت‌زایی می‌باشد که انتقال آن در مراکز انتقال خون و سایر مراکز بهداشتی از اهمیت ویژه‌ای

۵- منابع

- [1] <http://www.us.unaids.org/highband/projects/start-plan.html>
- [2] Piot P, Bartos M, Ghys PD, Walker N, Schwartlander B. The global impact of HIV/AIDS. *Nature* 2001; 410: 968-73.
- [3] Gayle HD, Hill GL. Global impact of human immunodeficiency virus and AIDS. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 327-35.
- [4] White DO, Fenner FJ. (ed.) *Medical Virology*. London; 1994.
- [5] Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. USA, 2001 Fields B.N, Fields virology, 4th edition, USA, Philadelphia, Lippincott-Raven 2001; Vol 2.
- [6] Ye RW, Wang T, Bedzyk L, Croker KM. Applications of DNA microarray in microbial systems. *J Microbiol Meth* 2001; 47: 257- 72.
- [7] Meng Q, Wong C, Rangachari A, Tamatsukuri M, Fliss E, Cheng L. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of Hepatitis B virus, Hepatitis C virus RNA, and Human immunodeficiency virus type 1 RNA. *JCM* 2001; 39(8): 2937-45.
- [8] Seifarth W, Spiess B, Zeilfelder U, Speth C, Hehlmann R, Leib-Mo'sch C. Assessment of retroviral activity using a universal retrovirus chip; *J Virol Meth*. 2003; 112: 79-91.
- [9] Clewley JP. A role for arrays in clinical virology: fact or fiction?. *J Clin Virol* 2004; 29: 2-12.
- [10] Xiang CC, Chen Y. cDNA microarray technology and its applications. *Biotech Adv* 2000; 18: 35-46.
- [11] Liu HC, He Z, Rosenwaks Z. Application of complementary DNA microarray (DNA chip) technology in the study of gene expression profiles during folliculogenesis. *Fertil & Steril* 2001; 75(5): 947- 55.
- [12] Hitt E. One chip, one genome. *Scientist* 2004; 18(13): 38- 9.
- [13] Albert J, Fenyo EM. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in

- clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. *J Clin Microbiol* 1990; 28(7), 1560-4.
- [14] Rogers YH, Jiang-Baucom P, Huang ZJ, Bogdanov V, Anderson S, Boyce-Jacino MT. Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: a method for preparation of DNA microarrays. *Anal Biochem* 1999; 266: 23-30.
- [15] Adessi C, Matton G, Ayala G, Turcatti G, Mermod JJ, Mayer P, Kawashima E. Solid phase DNA amplification: characterization of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E87.
- [16] Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 470- 6.