

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۳، شماره ۲: از ۳۳-۴۲
تابستان ۱۳۸۹

راه‌اندازی یک روش جدید سریع و حساس Nested PCR یک مرحله‌ای - یک لوله‌ای در سیستم بسته با استفاده از دو آغازگر متصل به هم برای تشخیص ویروس HCV

شهاب فلاحی^۱، مهرداد روانشاد^{۲*}، عدرا کنار کوهی^۱

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ویروس‌شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده علوم پزشکی،
دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ویروس‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

پذیرش مقاله: ۸۸/۱۲/۱۷

دریافت مقاله: ۸۸/۰۹/۰۸

چکیده

هدف: واکنش زنجیر پلیمرز یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌ها در زمینه زیست‌شناسی و تشخیص مولکولی است. با وجود سادگی در مفهوم این روش نیازمند کنش‌های پیچیده بین توالی هدف، آغازگرها، dNTP و آنزیم پلیمرز به‌منظور تکثیر و تشخیص موفق است. شناسایی ویروس‌های RNA دار نیازمند استفاده از روش‌هایی با حساسیت و ویژگی بالا است، بنابراین تکثیر براساس روش Nested PCR تا حدی منجر به بهبود حساسیت شده و از سوی دیگر، یک مرحله‌ای کردن روش مذکور باعث کاهش آلودگی‌های احتمالی خواهد شد. هدف از مطالعه حاضر راه‌اندازی و به‌کارگیری روش جدید، سریع و حساس Nested PCR یک مرحله‌ای - یک لوله‌ای در سیستم بسته با استفاده از دو آغازگر به هم چسبیده است. مواد و روش‌ها: در این مطالعه، روش جدید و ویژه‌ای از طراحی آغازگر به‌منظور یک مرحله‌ای - یک لوله‌ای کردن واکنش استفاده شد. روش طراحی شده پس از راه‌اندازی و بهینه‌سازی، روی نمونه‌های کنترل مثبت و منفی ارزیابی شد.

نتایج: روش راه‌اندازی شده، روی ۵۰ نمونه مثبت ویروس هپاتیت C، ۱۰ کنترل منفی ژنوم انسانی و ۵ نمونه از هرکدام از ویروس‌های هپاتیت B، نقص ایمنی اکتسابی انسان، هپاتیت G و تورکوتنو انجام گردید. براساس نتایج به‌دست آمده از مجموع آزمایشات میزان حساسیت و ویژگی روش طراحی شده، محاسبه شد. در ۴۸ مورد از ۵۰ نمونه مثبت باند مورد انتظار مشاهده گردید و در هیچ‌یک از نمونه‌های کنترل منفی باندها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: براساس سیستم ویژه طراحی آغازگر که در مطالعه حاضر استفاده شد، آغازگرهای داخلی به‌صورت مکمل حالت معمول PCR و چسبیده به آغازگرهای خارجی ساخته می‌شوند. احتمال اتصال آغازگرهای خارجی و داخلی به الگوهای نادرست در هر دو دور واکنش غیرممکن می‌شود و در نتیجه باندهای غیراختصاصی تولید نخواهد شد. برتری دیگر روش طراحی شده عدم وجود آلودگی به دلیل یک مرحله‌ای شدن و علاوه بر آن؛ کوتاه‌تر شدن زمان واکنش و نیز کاهش هزینه‌ها است.

کلیدواژه‌گان: PCR یک لوله‌ای - یک مرحله‌ای، Nested PCR، ویروس هپاتیت C، PCR سریع

۱- مقدمه

آغازگر، اختصاصیت و حساسیت PCR بالا می‌رود، این امر اساس روش Nested PCR را تشکیل می‌دهد. اما ایجاد آلودگی متقاطع در تکثیر مرحله دوم به وسیله محصولات دور اول مهم‌ترین عامل ایجاد نتایج مثبت کاذب و کاهش اعتماد به این روش است. پدیده ایجاد آلودگی به دلیل انتقال الگو از واکنش مرحله اول به لوله دوم، را شاید بتوان مهم‌ترین مشکل در هنگام استفاده از روش Nested PCR دو مرحله‌ای دانست [۷، ۱۱، ۱۲]. جلوگیری از ایجاد جواب‌های کاذب به علت ایجاد آلودگی و کاهش زمان آزمایش‌ها، یکی از مهم‌ترین خواسته‌های محققین در زمینه زیست‌شناسی مولکولی است. روش Nested PCR با وجود تمامی مزایای آن دارای زمان نسبتاً طولانی و احتمال بالای ایجاد آلودگی، به دلیل انتقال مواد واکنش دور اول به لوله جدید به‌منظور اجرای دور دوم PCR است. ترکیب واکنش‌های مرحله یک و دو در واکنش Nested PCR به روش‌های مختلف برای کاهش آلودگی گزارش شده است [۱۳-۱۷]. استفاده از دماهای اتصال مختلف و انجام آزمایش به‌صورت یک مرحله‌ای- یک لوله‌ای، از این روش‌هاست [۹، ۱۰، ۱۴]. روش دیگر جداسازی فیزیکی آغازگرها و دیگر مواد افزودنی مورد نیاز برای واکنش دوم از مواد واکنش دور اول در یک لوله بدون انتقال به لوله دوم است [۱۵، ۱۸-۲۰].

هدف از این مطالعه راه‌اندازی یک روش جدید سریع و حساس Nested PCR یک مرحله‌ای- یک لوله‌ای در سیستم بسته با استفاده از دو آغازگر به هم چسبیده، برای اولین بار است؛ به‌طوری که علاوه بر حساسیت و اختصاصیت مناسب، از معایب دیگر روش‌های ارایه شده نیز کاسته شود. در طراحی این روش هدف عمده، ارایه روشی برای کاهش زمان واکنش و نیز جلوگیری آلودگی متقاطع از منابع داخلی و خارجی است.

۲- مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق از بیماران آلوده به عفونت ویروس هپاتیت C (Hepatitis C Virus: HCV) C

پیشرفت‌های دو دهه اخیر در زمینه زیست‌شناسی مولکولی موجب ارتقای کارایی و تکامل هر چه بیشتر آزمایش‌های وابسته به اسیدنوکلئیک در علوم بالینی شده است. استفاده از نشانگرهای (Markers) غیر رادیواکتیو و اولیگونوکلئوتیدهای مکمل با ژن‌ها یا مترادف‌های ویژه بازهای آلی در DNA از جمله پیشرفت‌های مؤثر در بهبود و به‌کارگیری روزافزون آزمون‌های وابسته به DNA در طیف تشخیص بالینی محسوب می‌شود. یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌ها در زمینه زیست‌شناسی مولکولی که در عین حال کاربرد تشخیصی نیز دارد، واکنش زنجیر پلیمرز (Polymerase Chain Reaction: PCR) است که علاوه بر ایجاد سرعت در انجام آزمایش‌های وابسته به اسیدنوکلئیک در موارد متعدد موجب افزایش حساسیت این گونه آزمایش‌ها شده است. این روش منجر به تولید مقادیر کافی از توالی مورد نظر برای مقاصد آینده می‌شود [۱-۳]. آغازگرهای PCR (PCR Primers) به‌صورت کاملاً اختصاصی و مکمل ناحیه مورد نظر DNA هدف طراحی می‌شود. در طراحی آغازگر از نظر بسیاری از محققین رعایت چند قانون ساده برای کسب نتیجه مطلوب کفایت می‌کند و معمولاً از آغازگرهای بیش از ۳۰ نوکلئوتید در واکنش PCR استفاده نمی‌شود [۴-۶].

تشخیص ویروس‌های RNA دار نیازمند روش‌های با حساسیت و قدرت تشخیص بالا است [۷]. دوز عفونی پایین بسیاری از ویروس‌ها نیازمند آن است که روش‌های بررسی قادر به تشخیص تعداد کپی‌های بسیار کم ژنوم ویروس در نمونه‌های بیماران باشد [۸]. رسیدن به این سطح از حساسیت امروزه به‌عنوان یک چالش اساسی برای روش‌های اسیدنوکلئیک و مخصوصاً برای تشخیص RNA ویروس‌ها مطرح است؛ چرا که این ویروس‌ها نیازمند یک مرحله اضافی رونویسی معکوس در فرایند تشخیص هستند. تکثیر به‌صورت Nested PCR تا حدی منجر به بهبود حساسیت تشخیص شده است [۹-۱۱]. در این روش با استفاده از دو جفت

مراجعه کننده به مرکز تحقیقات میکروبی‌شناسی بالینی دکتر البرزی (شیراز، ایران) تهیه شد. مثبت بودن تمامی نمونه‌ها برای عفونت HCV با روش Real-Time PCR (Recombinant Immunoblot Assay) RIBA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) تأیید شده بود. بعد از خون‌گیری و جداسازی پلاسما، نمونه‌ها به آزمایشگاه HIV (Human Immunodeficiency Virus) و هپاتیت گروه و ویروس‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس منتقل و در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده ذخیره شد. RNA ی ویروس از ۱۴۰ میکرولیتر پلاسما با استفاده از کیت استخراج RNA کیزن (QIAamp Viral RNA mini kit, Qiagen) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. اجرای این تحقیق به تصویب کمیته‌های ایمنی زیستی و اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسید. فرم رضایت‌نامه برای کلیه بیماران شرکت کننده در تحقیق تهیه شده بود.

۲-۱- طراحی آغازگر

آغازگرهای طراحی شده برای این تحقیق در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند. این آغازگرها در داخل ژن UTR

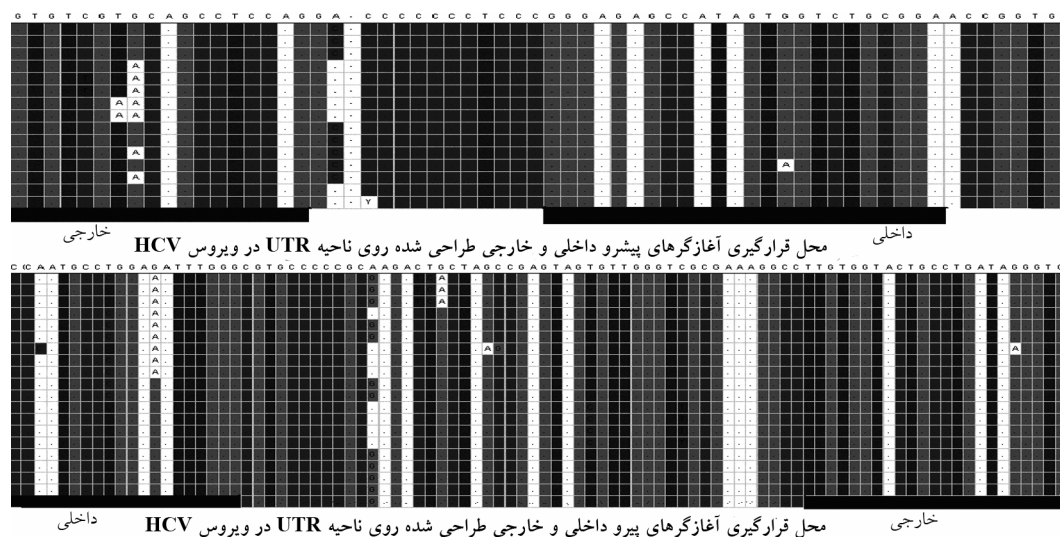
جدول ۱ ویژگی‌های کلی آغازگرهای طراحی شده

(Untranslated Region) ویروس HCV قرار دارند. طول ژن UTR در ژنوتیپ‌های مختلف از ۳۰۰-۳۵۰ باز است. آغازگرهای اختصاصی براساس هم‌ردیفی توالی‌های UTR (شکل ۱) از پایگاه GenBank با استفاده از نرم‌افزار Clustal W طراحی شد. این آغازگرها قادر به تکثیر ناحیه UTR ویروس HCV ژنوتیپ‌های 1a, 1b, 1c, 1j, 2, 3, 3a, 3b, 3k, 4, 5, 6, 6a, 6b, 6c, 6d, 6e, 6f, 6g, 6h, 6i, 6j, 6k, 6l, 6m است و براساس اطلاعات اولیه از ژنوم ویروس، آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که سویه‌های ویروسی شایع در ایران را با دقت بیشتری تشخیص دهند. آغازگرهای حاصل از بین طیف آغازگرهای طراحی شده با توجه به ویژگی‌های مورد نظر انتخاب شد. از نرم‌افزارهای Mega 4, Gen Runner, Oligo6, Oligo Analyzer برای تجزیه و تحلیل خصوصیات آغازگرهای طراحی شده نظیر طراحی آغازگر، تعیین خصوصیت توپولوژیک (Topologic) و ترمودینامیک (Thermodynamic) آن‌ها استفاده شد. طول قطعه ایجاد شده توسط آغازگرهای خارجی ۲۰۰ جفت‌باز و طول قطعه ایجاد شده توسط آغازگرهای داخلی ۱۱۰ جفت‌باز است.

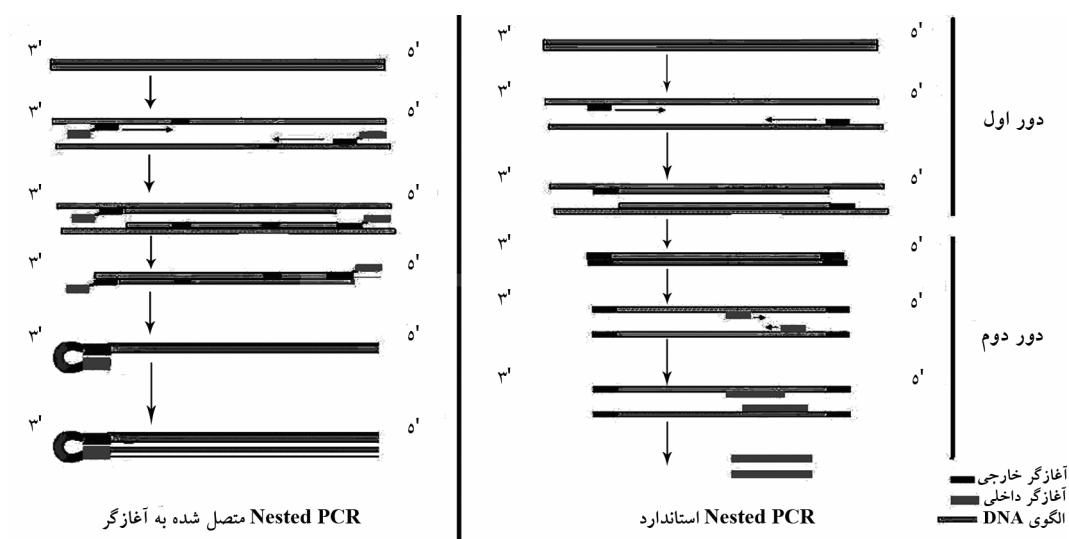
نام آغازگر	درصد GC	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)	طول آغازگر	توالی آغازگر
خارجی پیشرو	۶۰ درصد	۶۴/۱	۲۵	5'-TTC CGC AGA CCA CTA TGG CTC TCC C-3'
خارجی پیرو	۶۶/۷ درصد	۶۳/۴	۲۱	5'-CCT GGA GAT TTG GGC GTG CCC-3'
مکمل داخلی پیشرو	۶۶/۷ درصد	۵۸/۹	۱۸	5'-GTG TCG TGC AGC CTC CAG-3'
داخلی پیشرو	۶۶/۷ درصد	۵۸/۹	۱۸	5'-CTG GAG GCT GCA CGA CAC-3'
مکمل داخلی پیرو	۵۲/۲ درصد	۵۸/۶	۲۳	5'-CAC CCT ATC AGG CAG TAC CAC AA-3'
داخلی پیرو	۵۲/۲ درصد	۵۸/۶	۲۳	5'-TTG TGG TAC TGC CTG ATA GGG TG-3'
ناحیه لولا	-	-	-	TTTTTTT

جدول ۲ توالی آغازگرها به صورت مورد استفاده در آزمایش

آغازگرهای مورد استفاده پیشرو در انجام آزمایش	5'-TTC CGC AGA CCA CTA TGG CTC TCC C <u>TTTTTTT</u> GTG TCG TGC AGC CTC CAG-3'
آزمایش‌های مورد استفاده پیرو در انجام آزمایش	5'-CCT GGA GAT TTG GGC GTG CCC <u>TTTTTTT</u> CAC CCT ATC AGG CAG TAC CAC AA-3'



شکل ۱ محل قرارگیری آغازگرهای طراحی شده روی ژنوم HCV



شکل ۲ مقایسه شماتیک روش راه‌اندازی شده و Nested PCR

۲-۲- ترکیب آغازگرها

طراحی آغازگر برای اجرای روش مورد نظر براساس ناحیه ۴ از ژنوم مورد نظر به‌طور همزمان و با استفاده از یک دسته آغازگری استوار است. آغازگر پیشرو برای ناحیه UTR ویروس HCV شامل توالی مکمل الیگونوکلوئوتید داخلی پیشرو، یک توالی چندتایی از نوکلئوتید T به‌عنوان ناحیه لولا

و الیگونوکلوئوتید خارجی پیشرو است. در اینجا انتهای ۳' آغازگر داخلی از طریق ناحیه لولا به سر ۵' آغازگر خارجی متصل می‌شود. به‌منظور اطمینان از اتصال آغازگرهای داخلی در مرحله بعد از عملکرد آغازگرهای خارجی و در نتیجه اجرای فرایند مورد نظر به‌صورت صحیح، توالی نوکلئوتیدی به‌صورت مکمل حالت معمول ساخته شد. آغازگر پیشرو از

۲-۴- بهینه‌سازی واکنش Nested PCR

هنگامی که هدف بهینه‌سازی غلظت اجزا و شرایط یک واکنش باشد، یک روش تجربی آزمون و خطا به‌کار گرفته می‌شود، چرا که هیچ روشی برای پیش‌بینی کارایی ویژگی‌های انتخاب شده وجود ندارد [۲۱].

آغازگرهای این پژوهش روی نمونه‌های کنترل مثبت و منفی و نیز برای ارزیابی احتمال اتصال غیراختصاصی به ژنوم ویروس‌های HBV، HIV، TTV، و HGTV و ژنوم انسانی ارزیابی شد. دیگر اجزای PCR از قبیل $MgCl_2$ ، غلظت آغازگرها، دمای اتصال و تعداد چرخه‌های واکنش توسط چندین گرادیان واکنش بهینه شدند.

جدول ۳ خلاصه شرایط PCR انجام شده

مرحله	دما	زمان
جدا شدن اولیه دو رشته	۹۰ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه
جدا شدن دو رشته	۹۰ درجه سانتی‌گراد	۵۰ ثانیه
دو رگه شدن آغازگر و الگو	۶۲-۶۵ درجه سانتی‌گراد	۴۰ ثانیه
پیشروی	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۵۰ ثانیه
تعداد چرخه	-	۴۰
پیشروی نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۷ دقیقه

بعد از بهینه‌سازی واکنش، بهترین شرایط PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱۵۰ نانوگرم از DNA الگو، آغازگرهای پیشرو و پیرو هرکدام با غلظت نهایی ۰/۲ پیکوگرم، ۵ میکرومول مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مول)، DNA پلیمرز Taq با غلظت نهایی ۴ واحد بین‌المللی، یک میکرولیتر از $MgCl_2$ (۱۰ میلی‌مول) و ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR با غلظت اولیه ۱۰X (Fermentas) تعیین شد. واکنش تکثیر تحت شرایط دمایی: واسرشتی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۰ درجه سانتی‌گراد برای یک دور، ۴۰ دور به مدت ۵۰ ثانیه در ۹۰ درجه سانتی‌گراد و ۴۰ ثانیه در ۶۲-۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۵۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در پایان ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان گسترش نهایی قرار گرفت (جدول ۳). در مرحله آخر محصول

ناحیه مکمل الیگونوکلوئوتید داخلی پیرو، ناحیه لولا و الیگونوکلوئوتید خارجی پیرو تشکیل شده است. اصول روش طراحی و ساخت برای آغازگر پیرو شبیه مراحل مربوط در آغازگر پیشرو است. طول قطعه لولا در این مطالعه ۸ نوکلئوتید است و به‌منظور اتصال دو توالی نوکلئوتیدی و سهولت در انعطاف‌پذیری آغازگر داخلی، برای اتصال به ناحیه مکمل خود پس از عمل کردن آغازگر خارجی، بین این دو توالی قرار داده شده است (شکل ۲). به علت مکمل بودن آغازگر داخلی، این آغازگر در زمانی که آغازگر خارجی به الگو متصل است، قادر به اتصال به الگو و ساخت DNA نیست.

۲-۳- واکنش رونویسی معکوس

RNA استخراج شده بلافاصله برای واکنش رونویسی معکوس به‌کار گرفته شد. DNA مکمل (cDNA) با استفاده از یک محلول واکنش شامل آنزیم پلیمرز (Moloney M-MLV Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) و آغازگرهای خارجی پیرو طبق دستورالعمل شرکت سازنده با کمی تغییرات به‌منظور بهینه‌سازی شرایط برای آزمایش، ساخته و تکثیر شد. برای اجرای تحقیق ۵ میکرولیتر از RNA (حدود ۱۵۰ نانوگرم) به محلول واکنش در یک میکروتیوب حاوی آغازگر اختصاصی پیرو با غلظت نهایی ۰/۴ پیکوگرم اضافه شد که به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس ۴ میکرولیتر از بافر ۱۰X، مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مول) با غلظت نهایی ۰/۸ پیکوگرم (Fermentas) و نیم میکرولیتر از ممانعت‌کننده آنزیم RNase (RNase Inhibitor) (۲۵ واحد) (غلظت نهایی ۰/۵ واحد) (Fermentas) اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله آخر بعد از افزودن یک میکرولیتر از M-MLV (۲۰۰ واحد) (غلظت نهایی ۸ واحد) (Promega) به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

جدول ۴ خلاصه نتایج به‌دست آمده از ارزیابی روش راه‌اندازی شده با نمونه‌های مثبت و منفی

نمونه مورد مطالعه	نتایج به‌دست آمده		
	مثبت واقعی	منفی واقعی	مثبت کاذب
کنترل مثبت	۴۸	۰	۰
کنترل منفی	۰	۵	۰
HIV	۰	۵	۰
HBV	۰	۵	۰
HGV	۰	۵	۰
TTV	۰	۵	۰
مجموع	۴۸ (۹۶ درصد)	۳۰ (۹۷/۵ درصد)	۲ (۲/۵ درصد)

در ۴۸ مورد از ۵۰ نمونه مثبت باند مورد نظر مشاهده شد. در هیچ‌یک از نمونه‌های کنترل منفی انسانی و ویروسی هیچ بانندی مشاهده نشد. در نمونه‌های مثبت باند غیراختصاصی مشاهده نشد. در نمونه‌های مثبت پس از الکتروفورز محصولات PCR دو تا سه باند با فاصله حدود ۵۰ باز مشاهده شد و در نمونه‌های کنترل منفی این باندها مشاهده نمی‌شد. آغازگرهای طراحی شده در این مطالعه براساس تجزیه و تحلیل‌های انجام گرفته با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک قادر به تشخیص ژنوتیپ‌های 1a, 1b, 1c, 1j, 2, 3, 3a, 3b, 3k, 4, 5, 6, 6a, 6b, 6d, 6e, 6f, 6g, 6h, 6i, 6j, 6k, 6l, 6m, 6n, 6p و 6o ویروس HCV هستند.

۳-۱- مقایسه روش راه‌اندازی شده با روش

Nested PCR معمولی

به‌منظور مقایسه روش راه‌اندازی شده با روش Nested PCR معمولی از یک سری آغازگر دیگر در مطالعه شاهد زمانی و همکاران استفاده شد که توالی آن‌ها به‌صورت آغازگر خارجی پیشرو: 5'-AGC GTC TAG CCA TGG CGT-3' و خارجی پیرو: 5'-GCA CGG TCT ACG AGA CCT-3' داخلی پیشرو: 5'-GTG GTC TGC GGA ACC GG-3'

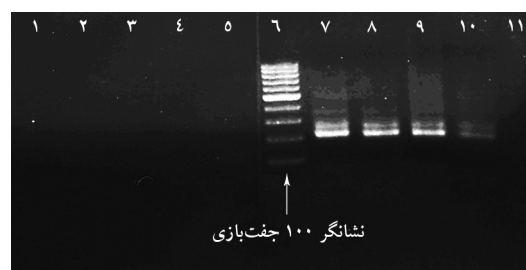
PCR توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد جداسازی و توسط رنگ‌آمیزی اتیدیوم برمایید (Ethidium bromide) در حضور نور اشعه ماورای بنفش آشکارسازی شد.

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

این مطالعه یک بررسی از نوع توصیفی و تجربی است، تعداد کل نمونه‌ها تعداد ۵۰ نمونه مثبت، ۱۰ نمونه کنترل منفی و تعداد ۵ نمونه از هرکدام از ویروس‌های HIV, HBV, HGV, TTV بود. برای بررسی داده‌های حاصل از روش راه‌اندازی شده تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ انجام گرفت.

۳-۳ نتایج

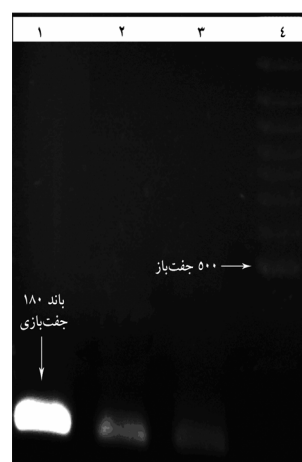
پس از بهینه‌سازی اجزای واکنش (شکل ۲ و ۳)، روش طراحی شده روی ۵۰ نمونه مثبت HCV، ۱۰ کنترل منفی ژنوم انسانی و ۵ نمونه از هرکدام از ویروس‌های HIV, HBV, هپاتیت G (Hepatitis G Virus: HGV)، ویروس تورکوتنو (Totque Teno Virus: TTV) به‌عنوان کنترل منفی ویروسی انجام شد. براساس نتایج به‌دست آمده از مجموع آزمایش‌ها، میزان حساسیت و ویژگی روش طراحی شده محاسبه شد (جدول ۴).



شکل ۳ تصویر باند مشاهده شده در PCR به همراه نمونه‌های کنترل؛ ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ نشانگر اندازه DNA (کنترل منفی ویروسی، ۵ کنترل منفی انسانی، ۶ نشانگر اندازه DNA، ۷، ۸، ۹ آزمایش در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد، ۱۰، ۱۱ آزمایش در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد)

آغازگر، رعایت چند قانون ساده برای کسب نتیجه مطلوب کفایت می‌کند و معمولاً از آغازگرهای بیش از ۳۰ نوکلئوتید در واکنش PCR استفاده نمی‌شود [۵، ۶، ۲۳]. هنگامی که از دماهای مختلف برای اتصال آغازگرهای پیرو و پیشرو در زمان‌های متفاوت استفاده می‌شود، با توجه به این که آغازگرها در یک محدوده دمایی قادر به اتصال به الگو هستند و اتصال آن‌ها به هدف وابسته به یک دمای خاص نیست، احتمال اتصال آغازگرهای داخلی و خارجی به صورت نامناسب در دماهایی غیر از دمای تعیین شده نیز وجود دارد. برای رفع این مشکل، در این مطالعه آغازگرهای پیشرو به صورت معمولی و آغازگرهای پیرو به صورت مکمل حالت معمول طراحی و ساخته شد. با این روش امکان اتصال هر دو جفت آغازگری در یک زمان و در یک مرحله به طور کامل از بین می‌رود و در نتیجه احتمال ایجاد محصولات ناخواسته به دلیل دمای اتصال به صفر می‌رسد. در روش‌هایی که از سدهای فیزیکی برای جداسازی آغازگرهای داخلی و خارجی استفاده می‌شود، امکان ایجاد مشکل در واکنش مورد انتظار در دو حالت پیش می‌آید. در حالت اول؛ احتمال ورود آلودگی از منبع خارجی تهیه کننده سد فیزیکی و در مورد دوم؛ احتمال عدم توانایی سد فیزیکی در جلوگیری کامل از مخلوط شدن مواد در دو مرحله وجود دارد، که این دو مسئله در مطالعه حاضر از طریق روش ویژه طراحی آغازگر و نحوه عملکرد آن‌ها که در بخش‌های قبل توضیح داده شد، برطرف شد. طراحی آغازگرهای مورد مطالعه طبق اصول عمومی طراحی آغازگر صورت گرفت، اما در مراحل آخر به منظور اجرای فرایند مورد نظر، همان‌طور که در بخش مواد و روش‌ها ذکر شد، تغییراتی در طول، نحوه قرارگیری و ترکیب آن‌ها اعمال شد که مهم‌ترین تغییرات صورت گرفته عبارت بود از: ساخت آغازگر داخلی به صورت مکمل حالت معمول، استفاده از ناحیه لولا و اتصال آغازگرهای داخلی و خارجی به منظور بالا بردن کارایی روش، از طریق افزایش احتمال اتصال آغازگرهای داخلی به الگو در مرحله دوم واکنش. با توجه به نوع واکنش صورت گرفته براساس

داخلی پیرو: 5'-GGG CAC TCG CAA GCA CCC-3' است. لازم به ذکر است که شرایط انجام واکنش نیز مانند شرایط گزارش شده در مقاله شاهرمانی و همکاران انجام شد [۲۲]. به منظور مقایسه این دو روش، ۵۰ نمونه سنجش شده با روش یک لوله‌ای با روش معمولی نیز آزمایش شد. پس از انجام آزمایش‌ها، کلیه نمونه‌هایی که با روش راه‌اندازی شده مثبت شده بود، با روش معمولی نیز مثبت و دو مورد منفی شده در روش یک لوله‌ای در روش معمولی نیز منفی شد.



شکل ۴ تصویر باند مشاهده شده در Nested PCR معمولی؛ (۱) نمونه ۱، (۲) نمونه ۲، (۳) نمونه ۳، (۴) نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی

۴- بحث

استفاده از دماهای مختلف، برای اتصال آغازگرهای خارجی در دمای بالاتر و سپس اتصال آغازگرهای داخلی در دمای پایین‌تر از روش‌های مورد استفاده به منظور یک مرحله‌ای کردن Nested PCR است [۹، ۱۰، ۱۴]. روش دیگر جداسازی فیزیکی آغازگرها و دیگر مواد افزودنی مورد نیاز برای واکنش دوم از واکنش دور اول در یک لوله به روشی است که در هنگام نیاز بدون باز کردن درب لوله، مواد به محیط واکنش وارد شود. هرکدام از این روش‌ها دارای مزایا و معایب خاص خود است [۱۵، ۱۸-۲۰]. از نظر بسیاری از محققین در طراحی

مواد مربوط به مرحله دوم به مرحله اول است [۷، ۹، ۱۰، ۱۳-۱۷]. با توجه به سیستم ویژه طراحی آغازگر در مطالعه حاضر که در آن آغازگرهای داخلی به صورت مکمل حالت معمول PCR و چسبیده به آغازگرهای خارجی ساخته می‌شود، اتصال آغازگرهای خارجی و داخلی به علت عدم وجود الگوی مناسب آن‌ها در مرحله غیرمرتبط در دور اول یا دوم و در نتیجه ایجاد باندهای ناخواسته از لحاظ عملی امکان‌پذیر نیست. برتری دیگر روش مورد بحث در پیش‌گیری از آلودگی، عدم استفاده از مواد با منشا خارجی در روش ایجاد سد فیزیکی است که احتمال ایجاد آلودگی از دیگر منابع را از بین می‌برد. با توجه به حذف مرحله دوم از واکنش Nested PCR معمول توسط روش ابتکاری محققین، زمان مورد نیاز برای انجام واکنش یک مرحله‌ای به حدود نصف زمان مورد نیاز برای روش Nested PCR دو مرحله‌ای کاهش می‌یابد.

براساس مطالب ذکر شده در بالا و نیز مقایسه با روش Nested PCR معمولی، به نظر می‌رسد روش پیشنهادی این مطالعه دارای حساسیتی حداقل به اندازه روش دو مرحله‌ای، اختصاصیت بیشتر و مدت زمان اجرا و احتمال آلودگی بسیار کمتر است. به‌طور خلاصه روش جدید، بسیار آسان و مؤثر ارایه و به‌طور موفقیت‌آمیز برای تشخیص HCV از نمونه‌های پلاسما انسانی ارزیابی شد. به نظر می‌رسد روش مورد بحث، می‌تواند برای تشخیص حساس و سریع دیگر ویروس‌ها به کار گرفته شود.

۵- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه تربیت مدرس برای تأمین هزینه‌های این طرح تشکر و قدردانی می‌شود و نیز از کلیه کسانی که با کمک‌های علمی خویش ما را در اجرای این پروژه یاری نمودند سپاسگزار می‌کنیم.

سیستم ویژه طراحی آغازگر در بررسی محصولات PCR، امکان مشاهده دو یا سه باند وجود دارد. در توضیح حضور دو یا سه باند در یک واکنش می‌توان گفت، در صورتی که آغازگرهای خارجی به الگوی خود در واکنش متصل شود، یک رشته می‌سازد؛ حال اگر آغازگرهای داخلی نیز واکنش مربوط به خود را انجام دهد، ساخت این رشته کامل می‌شود، اما در صورتی که این آغازگرها نتواند رشته مربوط به خود را بسازد، رشته اولیه باقی می‌ماند، به این ترتیب امکان حضور حداقل دو باند وجود دارد. یکی از روش‌هایی که از لحاظ سیستم طراحی آغازگر مشابه آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه حاضر است، روش LAMP (Loop mediated Isothermal Amplification) است [۲۲، ۲۴]. با مقایسه مواد و اجزای مورد استفاده در این دو واکنش مشخص می‌شود که در هر دو آزمایش، زمان انجام واکنش تا حد زیادی کاهش می‌یابد و نیز با شناسایی چند ناحیه از ژنوم مورد نظر به‌طور همزمان، اختصاصیت روش تا حد زیادی افزایش می‌یابد. ولی با توجه به تعداد بسیار زیادتر آغازگرهای روش LAMP که دارای یک فرایند طراحی پیچیده، طولانی و هزینه بالاتر است و نیز نوع آنزیم مورد استفاده که بسیار گران‌تر از آنزیم *Taq* پلیمرز است، به‌نظر می‌رسد که روش طراحی شده مناسب و دارای صرفه اقتصادی بیشتری است. با یک مقایسه کلی مشخص می‌شود که عمده‌ترین روش‌ها برای یک مرحله‌ای کردن یک واکنش Nested، استفاده از آغازگرهای داخلی و خارجی با دمای واسرشتی (T_m) مختلف و استفاده از سدهای فیزیکی برای جداسازی مواد و اجزای مرحله اول و دوم است [۷، ۹، ۱۰]. معمول‌ترین نقص مشترک این دو روش، حضور باندهای غیراختصاصی در محصول نهایی PCR است که به دلیل احتمال اتصال آغازگرهای خارجی حتی در T_m بالاتر از دمای اتصال آغازگرهای داخلی در روش اول یا به دلیل احتمال نشد

۶- منابع

[1] Najafabadi HS, Torabi N, Chamankhah M.

Designing multiple degenerate primers via

- consecutive pairwise alignments. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 50.
- [2] DiGirolamo, N. Algorithms for the Multiple Degenerate Primer Selection Problem. (Manuscript). 2008, http://www.cse.uconn.edu/~huang/REU_08/Reports/Nikoletta_DiGirolamo.pdf.
- [3] Kwok S, Chang SY, Sninsky JJ, Wang A. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods Appl* 1994; 3(4): S39-47.
- [4] Burpo, FJ. A critical review of PCR primer design algorithms and cross-hybridization case study. *Biochimistry* 2001; 218: 1-12.
- [5] McPherson MJ, Møller SG. *PCR*. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2000; p: 288.
- [6] Apichonbancha K, Dasgupta B, Jun J, Mandoiu I, Mendonca E. A Review of the Primer Approximation Multiplex PCR (PAMP) Technique for Detecting Large Scale Cancer Genomic Lesions. *Curr Bioinformatics* 2008; 4(1):1-7.
- [7] Ratcliff RM, Doherty JC, Higgins GD. Sensitive detection of RNA viruses associated with gastroenteritis by a hanging-drop single-tube nested reverse transcription-PCR method. *J Clin Microbiol* 2002; 40(11): 4091-9.
- [8] Berg DE, Kohn MA, Farley TA, McFarland LM. Multi-state outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl2): S381-6.
- [9] Mathis A, Weber R, Kuster H, Speich R. Simplified sample processing combined with a sensitive one-tube nested PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35(7): 1691-5.
- [10] Llop P, Bonaterra A, Peñalver J, López MM. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(5): 2071-8.
- [11] Lee SE, Kim SY, Kim SJ, Kim HS, Shin JH, Choi SH, Chung SS, Rhee JH. Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36(10): 2887-92.
- [12] Rocha MA, Barbosa EF, Guimarães SE, Dias Neto E, Gouveia AM. A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls. *Vet Microbiol* 1998; 63(1): 1-11.
- [13] Nogva HK, Evensen SA, Madshus IH. One-tube multiplex RT-PCR of BCR-ABL transcripts in analysis of patients with chronic myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia. *Scand J Clin Lab Invest* 1998; 58(8): 647-54.
- [14] Ratcliff RM, Chang G, Kok T, Sloots TP. Molecular diagnosis of medical viruses. *Curr Issues Mol Biol* 2007; 9(2): 87-102.
- [15] Tao SC, Jiang D, Lu HL, Xing WL, Zhou YX, Cheng J. One-tube nested RT-PCR enabled by using a plastic film and its application for the rapid detection of SARS-virus. *Biotechnol Lett* 2004; 26(3): 179-83.
- [16] McGoldrick A, Bensaude E, Iyata G, Sharp G, Paton DJ. Closed one-tube reverse transcription nested polymerase chain reaction for the detection of pestiviral RNA with fluorescent

- probes. *J Virol Methods* 1999; 79(1): 85-95.
- [17] Olmos A, Esteban O, Bertolini E, Cambra M. Nested rt-PCR in a single closed tube. *Methods Mol Biol* 2003; 226: 151-60.
- [18] Wolff C, Hörnschemeyer D, Wolff D, Kleesiek K. Single-tube nested PCR with room-temperature-stable reagents. *PCR Methods Appl* 1995; 4(6): 376-9.
- [19] Olmos A, Cambra M, Esteban O, Gorris MT, Terrada E. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. *Nucleic Acids Res* 1999; 27(6): 1564-5.
- [20] Walsh EE, Falsey AR, Swinburne IA, Formica MA. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for diagnosis of respiratory syncytial virus infection in adults: use of a single-tube "hanging droplet" nested PCR. *J Med virol* 2001; 63(3): 259-63.
- [21] Gaspar JO, Belintani P, Almeida AM, Kitajima EW. A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct carlavirus species. *J Virol Methods* 2008; 148(1-2): 283-5.
- [22] Shahzamani K, Sabahi F, Merat SH, Rezvan H, Samiee SM, Karimi AM. The use of a sensitive RT-Nested PCR method for detection of hepatitis C virus. *Modares J Med Sci* 2007; 10(2): 35-41. (Persian)
- [23] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002; 16(3): 223-9.
- [24] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(12): E63.