

ارزیابی روش Touchdown Nested PCR برای جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی و افزایش اختصاصیت در تکثیر ژنی ویروس های نقص ایمنی انسان و هپاتیت جی

چکیده:

مقدمه و هدف: یکی از پارامترهای مهمی که در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای برای بهینه‌سازی می‌توان در نظر گرفت، دمای دورگه شدن پرایمر با DNA الگو می‌باشد. یکی از تغییرات صورت گرفته در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معمولی استفاده از روش Touchdown PCR است که بر خلاف برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معمولی و استاندارد که از یک دمای اتصال ثابت برای تکثیر توالی استفاده می‌شود، در این روش محدوده‌ای از درجه حرارت‌های اتصال استفاده می‌شود. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی کارایی روش Touchdown Nested PCR برای جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی و افزایش اختصاصیت در تکثیر ژنی طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها: این یک مطالعه تجربی است که طی سال‌های ۱۳۸۸ - ۱۳۸۷ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. نمونه‌های جمعیت مورد بررسی در این مطالعه، ۲۵ مورد پلاسمای بیماران آلوده به ویروس هپاتیت جی و ۲۵ مورد پلاسمای بیماران آلوده به ویروس نقص ایمنی انسان بودند. بعد از استخراج اسید نوکلئیک، طراحی پرایمرهای مورد نظر برای دو ویروس نقص ایمنی انسان و هپاتیت جی و ساخت cDNA، روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای به دو صورت استاندارد و Touchdown بر روی نمونه‌های کنترل مثبت و منفی انجام شد.

یافته‌ها: در تمامی نمونه‌های مثبت باند مورد نظر مشاهده شد، در حالی که در هیچ یک از نمونه‌های کنترل منفی انسانی و ویروسی هیچ باندهای مشاهده نشد. در نمونه‌های مثبت با روش استاندارد، پس از الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، باندهای غیر اختصاصی به ویژه در نمونه‌های ویروس نقص ایمنی انسان و به مقدار کمتری در نمونه‌های ویروس هپاتیت جی مشاهده شد. پس از اجرای پروتکل Touchdown میزان باندهای ناخواسته و غیر اختصاصی، تا حد زیادی کاهش یافت و یا کاملاً حذف شد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر علی‌رغم شکل‌گیری باندهای ناخواسته در واکنش استاندارد، با اجرای پروتکل Touchdown باندهای اضافی بدون این که اثر منفی در میزان محصول نهایی ایجاد شود، به میزان قابل توجهی کاهش یافتند. با توجه به سادگی این روش و نیز عدم ایجاد هزینه و مراحل کاری اضافی به نظر می‌رسد که استفاده از این پروتکل برای بهینه‌سازی سریع واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز، روشی منطقی و به صرفه باشد.

واژه‌های کلیدی: Touchdown Nested PCR، اتصالات غیر اختصاصی، افزایش اختصاصیت، تکثیر ژنی

شهاب فلاحي *

مهرداد روانشاد **

عذرا کنارکوهی *

رضا قنبری *

محبوبه حاجی‌عبدالباقي ***

کارشناس ارشد ویروس‌شناسی پزشکی، دانشگاه

تربیت مدرس تهران، دانشکده علوم پزشکی، کمیته

تحقیقات دانشجویی، گروه ویروس‌شناسی پزشکی

دکترای ویروس‌شناسی پزشکی، استادیار

دانشگاه تربیت مدرس تهران، دانشکده علوم پزشکی،

گروه ویروس‌شناسی پزشکی

متخصص بیماری‌های عفونی، استاد دانشگاه

علوم پزشکی تهران، بیمارستان امام

خمینی(ره)، گروه بیماری‌های عفونی

تاریخ وصول: ۱۳۸۸/۹/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۰/۱۳

مؤلف مسئول: مهرداد روانشاد

پست الکترونیکی: Ravanshad@modares.ac.ir

مقدمه

پلی‌مراز آشیانه‌ای روشی است که در آن از دو جفت آغازگر برای تکثیر توالی مورد نظر استفاده شود (۱۲ - ۱۰). در ابتدا جفت اول پرایمرها ناحیه‌ای خارج از توالی مورد نظر را تکثیر می‌کنند و سپس جفت دوم به نواحی داخلی‌تر محصولات اولیه متصل شده و ناحیه مورد نظر را تکثیر می‌کنند، بنا بر این هم حساسیت و هم اختصاصیت روش افزایش می‌یابد (۱۳ و ۱۰). پارامترهای مهمی که در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای برای بهینه‌سازی می‌توان در نظر گرفت، شامل: دمای دورگه شدن پرایمر با DNA الگو، تعداد سیکل‌های مورد استفاده در هر دو راند، غلظت پرایمرها، یون منیزیم، بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای و بهره‌گیری از مکمل‌ها می‌باشند (۱۵ و ۱۴). روش‌هایی مانند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای، واکنش زنجیره لیگان^(۴) و زنجیره DNA منشعب^(۵) که بر اساس عمل بر روی DNA کار می‌کنند، از لحاظ عملکردی بستگی کامل به اتصال پرایمرها به توالی هدف دارند (۱۶).

یکی از تغییرات صورت گرفته در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معمولی استفاده از روش Touchdown PCR است که برخلاف برنامه PCR معمولی و استاندارد که از یک دمای اتصال ثابت برای تکثیر استفاده می‌شود، در Touchdown PCR محدوده‌ای از درجه حرارت‌های اتصال استفاده می‌شود. در این نوع

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز^(۱) رایج‌ترین تکنیک مورد استفاده در آزمایشگاه‌های مولکولی است که برای تکثیر یک توالی اختصاصی به کار می‌رود (۱). این روش منجر به تولید مقدار زیادی از توالی اولیه، به منظور دستکاری‌های مولکولی یا اهداف تشخیصی می‌گردد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یک روش سریع و آسان برای تکثیر ژنی ایجاد می‌کند و در بسیاری از موارد دارای فواید اثبات شده‌ای برای آزمایش بالینی طیف وسیعی از عفونت‌های بیماری‌زا از قبیل ویروس عامل سندرم اکتسابی نقص ایمنی انسانی^(۲) نسبت به دیگر روش‌های مورد استفاده رایج در آزمایشگاه است (۳ و ۲).

تشخیص ویروس‌های با ژنوم RNA نیازمند روش‌های بسیار حساس و با قدرت تشخیص بالا است که این امر به دلیل دوز عفونی پایین بسیاری از ویروس‌ها و در نتیجه نیازمندی به روش‌های بررسی با قدرت تشخیص تعداد کپی‌های بسیار کم ویریون در نمونه‌های بیماران است (۵ و ۴). دستیابی به این سطح از حساسیت، امروزه به عنوان یک چالش اساسی برای روش‌های مولکولی و مخصوصاً برای تشخیص ویروس‌های RNA دار مطرح می‌باشد، چرا که این ویروس‌ها نیازمند یک مرحله اضافی رونویسی معکوس در پروسه تشخیص هستند. تکثیر از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای^(۳) تا حدی منجر به بهبود حساسیت تشخیص شده است (۷ و ۶).

روش‌های جدیدی بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسعه یافته‌اند (۹ و ۸). واکنش زنجیره‌ای

1-Polymerase Chain Reaction (PCR)
2-Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)
3-Nested PCR
4-Ligase Chain Reaction.(LCR)
5-branched DNA

نمونه‌های جمعیت مورد بررسی در این مطالعه بیماران آلوده به ویروس هپاتیت جی^(۱) و نقص ایمنی انسان^(۲) بودند. اجرای این تحقیق به تصویب کمیته ایمنی زیستی و اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسید. همچنین فرم رضایت‌نامه برای کلیه بیماران شرکت کننده در تحقیق تهیه و تکمیل شد. تعداد ۲۵ نمونه خون از هر کدام از افراد آلوده به ویروس نقص ایمنی انسان و ویروس هپاتیت جی به ترتیب از مرکز تحقیقات ویروس نقص ایمنی انسان بیمارستان امام خمینی و مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان شریعتی تهران تهیه شدند. مثبت بودن نمونه‌ها برای ویروس نقص ایمنی انسان و هپاتیت جی قبلاً به ترتیب با روش‌های وسترن بلات و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تأیید شده بود. حدود ۱۰ سی‌سی خون محیطی از بیماران گرفته شده و در لوله‌های استریل حاوی ماده ضدانعقاد EDTA ریخته شد. کلیه نمونه‌ها بعد از تهیه شدن در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

RNA ویروس از ۱۴۰ میکرولیتر پلاسما با استفاده از کیت استخراج RNA کیاژن (آمریکا) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و پس از آن کنترل کیفی انجام شد.

به منظور ارزیابی کامل روش مورد نظر از یک سری پرایمر معمولی برای ناحیه UTR ویروس هپاتیت جی و از یک سری پرایمر ناهمخوان^(۳) مربوط به ژن

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در سیکل‌های اولیه درجه حرارت اتصال بالا می‌باشد که در سیکل‌های بعدی درجه حرارت اتصال در هر سیکل یک درجه کاهش پیدا می‌کند، به طوری که در ۱۰ سیکل آخر درجه حرارت اتصال ثابت باقی می‌ماند. این کاهش متوالی درجه حرارت اتصال سبب می‌شود که بهترین درجه حرارت اتصال پرایمر - هدف انتخاب شود. در این نوع واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در دمای بالا، اتصال پرایمر به الگو و در نتیجه محصولات تولید شده، کاملاً اختصاصی و دقیق است، سپس همان‌طور که درجه حرارت کاهش می‌یابد پرایمرها به سکانس‌های غیراختصاصی باند می‌شوند و محصولات غیراختصاصی به وجود می‌آورند، ولی این محصولات نسبت به محصولات اختصاصی بسیار کم می‌باشند و نمی‌توانند تأثیر چندانی در کیفیت محصول نهایی ایجاد کنند. روش Touchdown Nested PCR اغلب برای ساده کردن مراحل تعیین درجه حرارت اتصال در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به کار می‌رود (۲۱-۱۷).

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی کارایی روش Touchdown Nested PCR برای جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی و افزایش اختصاصیت در تکثیر ژنی طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

این یک مطالعه تجربی است که طی سال‌های ۱۳۸۸ - ۱۳۸۷ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

1-Hepatitis G Virus (GBV-C)
2-Human Immunodeficiency Virus (HIV)
3-Degenerate

پرومگا(آمریکا)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل شد.

تمام مراحل انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در زیر هودکلاس II انجام و حجم نهایی واکنش‌های انجام گرفته ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. برای واکنش دور اول و دوم از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، محلول ۱X بافر، کلرید منیزیم با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، مخلوط نوکلئوتیدها^(۶) با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار، مقدار ۳/۷۵ پیکومول از پرایمرهای خارجی، ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم پلی‌مرز Taq، ۵ میکرولیتر DNA الگو (ژنوم ویروس) به میکروتیوب واکنش اضافه شد و حجم نهایی با آب مقطر دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

در دور اول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز، مخلوط بالا در دستگاه ترموسایکلر قرار داده و این برنامه برای آن اعمال شد؛ دمای اولیه جدا شدن دو رشته الگو ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای جدا شدن دو رشته الگو ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه برای هردو ویروس، دمای اتصال پرایمر به الگو ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای پیشروی ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه و ۳۰ سیکل از مرحله ۲ تا ۴ تکرار شد. دمای پیشروی نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه در نظر گرفته شد.

پوشش^(۱) ویروس نقص ایمنی انسان برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز آشیانه‌ای استفاده شد. پرایمرها بر اساس اصول استاندارد طراحی پرایمر و با استفاده از نرم افزارهای الیگوآنالیزر^(۲)، الیگو۶^(۳) و ژن رانر^(۴) جهت آنالیز ویژگی‌های ساختاری و ترمودینامیکی طراحی شدند. پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار بلاست^(۵) مورد آنالیز قرار گرفتند.

توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر می‌باشند؛ پرایمرهای مورد استفاده برای HIV به صورت خارجی پیشرو: 5'-CCA ATT CCY ATA CAT TAY TGT GCC-3' خارجی پیرو: 5'-TGT TRA ATG GCA GTC TAG CAG-3' داخلی پیشرو: 5'-RAT GGG AGG GGC ATA YAT TG-3' و داخلی پیرو: 5'-RAT GGG AGG GGC ATA YAT TG-3' و پرایمرهای مورد استفاده برای HGV به صورت: خارجی پیشرو: 5'-GGTCGTAAATCCCGGTCACC-3' خارجی پیرو: 5'-CCCACTGGTCCTTGCAACT-3' داخلی پیشرو: 5'-TAGCCACTATAGGTGGGTCT-3' و داخلی پیرو: 5'-ATTGAAGGGCGACGTGGACC-3' بودند.

برای ساخت cDNA ابتدا قسمتی از RNA ژنومی به وسیله یکی از پرایمرها شناسایی و هیبرید شد و سپس آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، پرایمر مورد نظر را شناسایی و با استفاده از بافر، dNTP و رشته الگو، شروع به تولیدسازی و ساخت رشته نمود.

برای انجام پروسه ۵ میکرولیتر RNA مورد نظر با استفاده از آنزیم M-MLV ساخت شرکت

1-Envelope
2-Oligo Analyzer
3-Oligo6
4-Gene Runner
5-BLAST
6-dNTPs

۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۵ ثانیه و گسترش به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. سپس ۵ مرحله دیگر که هر کدام شامل ۵-۴ دور، با دمای واسرشتی و گسترش مشابه مرحله اول بودند، انجام شد. در حالی که دمای اتصال در هر مرحله دو درجه نسبت به مرحله قبل از خود کاهش یافت به صورتی که دمای اتصال در ۴ دور نهایی به ۶۲ درجه سانتی‌گراد رسید. در پایان، یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد.

در مرحله آخر محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد جداسازی و با رنگ آمیزی اتیدیوم برمایید در حضور نوراشعه ماوراء بنفش آشکارسازی شدند. محصولات واکنش به منظور تأیید نتایج، برای تعیین توالی به آزمایشگاه بیمارستان طالقانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران ارسال شدند.

یافته‌ها

پس از بهینه‌سازی اجزای واکنش، روش طراحی شده بر روی ۳۵ نمونه مثبت ویروس هپاتیت جی و ویروس نقص ایمنی انسان، ۵ کنترل منفی ژنوم انسانی و ۵ نمونه از هر کدام از ویروس‌های هپاتیت بی، ویروس TT و هپاتیت سی به عنوان کنترل منفی ویروسی انجام شد.

در تمامی نمونه‌های مثبت باند مورد نظر مشاهده شد، در حالی که در هیچ یک از نمونه‌های کنترل منفی انسانی و ویروسی هیچ بانده مشاهده

پروسه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران دور دوم طبق این برنامه انجام شد. دمای جدا شدن اولیه دو رشته الگو ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، دمای جدا شدن دو رشته ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای جفت شدن پرایمر با الگو ۶۴ درجه به مدت ۲۵ ثانیه، دمای پیشروی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۲۵ سیکل از مرحله ۲ تا ۴ تکرار شد، دمای پیشروی نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه بود.

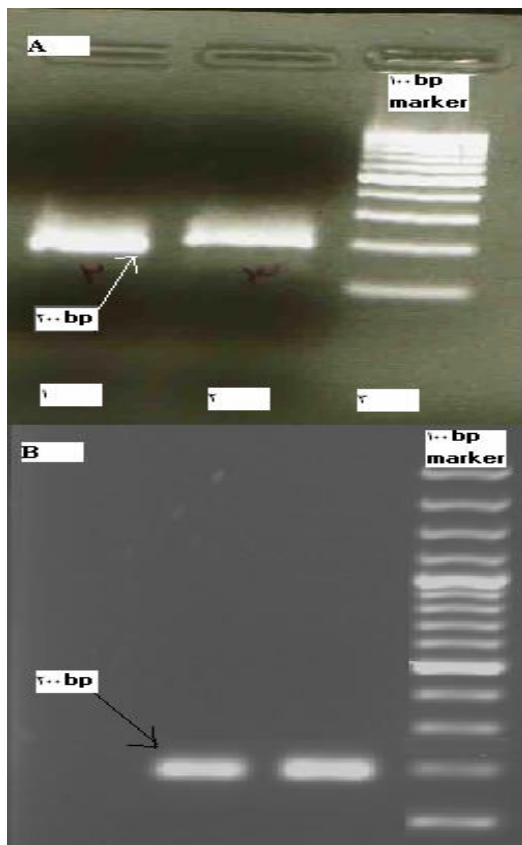
برنامه دمایی واکنش Touchdown PCR برای ویروس نقص ایمنی انسان به این شرح بود؛ واسرشتی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴ دقیقه، واسرشتی ثانویه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه و گسترش به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. سپس ۸ مرحله دیگر که هر کدام شامل ۳ دور، با دمای واسرشتی و گسترش مشابه مرحله اول بودند انجام شد، در حالی که دمای اتصال در هر مرحله یک درجه نسبت به مرحله قبل از خود کاهش می‌یافت به صورتی که دمای اتصال در ۳ دور نهایی به ۵۳ درجه سانتی‌گراد رسید. در پایان، یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه انجام شد.

واکنش Touchdown PCR برای ویروس هپاتیت جی به این شرح بود؛ واسرشتی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، واسرشتی ثانویه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال

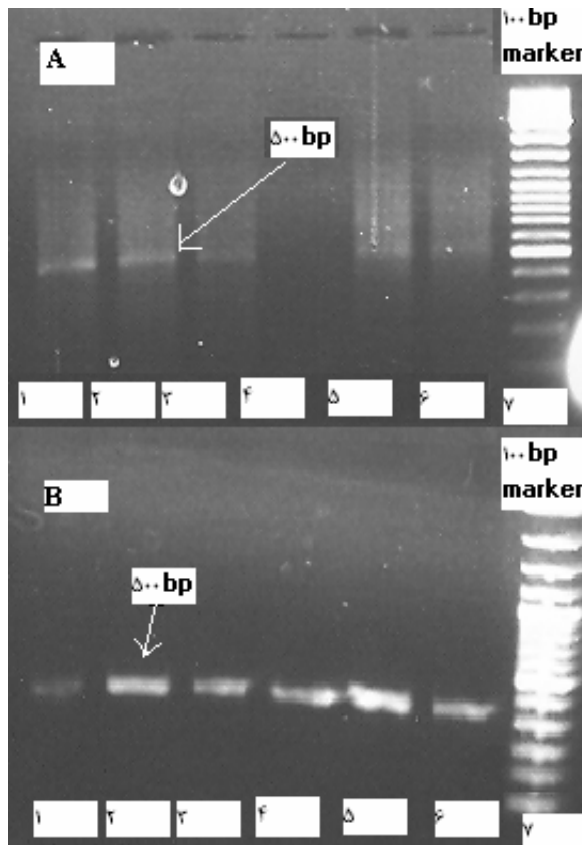
بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اثبات کارایی برنامه Touchdown در افزایش دقت و حساسیت روش واکنش زنجیره‌ای مطالعه‌های متعدد (۱۷-۱۹)، هدف از این مطالعه راه‌اندازی و بهینه‌سازی یک پروتکل Touchdown برای تکثیر ژنومی ویروس‌های نقص ایمنی انسان و هیپاتیت جی بود.

نشد. در نمونه‌های مثبت با روش استاندارد، پس از الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران، باندهای غیر اختصاصی به ویژه در نمونه‌های ویروس نقص ایمنی انسان و به مقدار کمتری در نمونه‌های ویروس هیپاتیت جی مشاهده شد. پس از اجرای پروتکل Touchdown میزان باندهای ناخواسته و غیر اختصاصی، تا حد زیادی کاهش یافت و یا کاملاً حذف شد (تصاویر ۱ و ۲). قابل ذکر است که اجرای پروتکل Touchdown در موارد زیادی موجب بهبود کیفیت باندهای مشاهده شده گردید.



تصویر ۲: A: محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران آشیانه‌ای استاندارد. B: محصولات Touchdown Nested PCR. ۱-۲: نمونه‌های ویروس هیپاتیت جی، ۳: مارکر ۱۰۰ bp



تصویر ۱: A: محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران آشیانه‌ای استاندارد. B: محصولات Touchdown Nested PCR. ۱-۶: نمونه‌های ویروس نقص ایمنی انسان، ۷: مارکر ۱۰۰ bp

یک مشکل عمده و رایج در تکثیر ژن‌ها با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران، خصوصاً در مورد ژنوم‌های پیچیده، ظهور باندهای کوچک ناخواسته در طیف محصولات مورد نظر است. این پدیده به طور معمول به علت اتصال نادرست یک یا هر دو پرایمر مورد استفاده به الگوی هدف یا از یک منبع آلودگی خارجی یا داخلی رخ می‌دهد (۲۲ و ۱۷). در موارد زیادی این محصولات فرعی به دلیل شانس بیشتر تکثیر قطعات کوچک‌تر نسبت به توالی‌های بزرگ‌تر در واکنش، از نظر مقدار نهایی برتری می‌یابند. به طور معمول برای غلبه بر این مسئله از کاهش مقدار منیزیم و افزایش دمای اتصال استفاده می‌شود که اغلب وقت‌گیر و پرهزینه هستند (۱۷). آنالیز ژنوتیپی و ویروس نقص ایمنی انسان مقاوم به دارو، یک فاکتور اساسی برای اجرای برنامه درمان چندارویی است. با توجه به اهمیت موضوعاتی از این قبیل و مشکلات تکثیر ژنی برای تشخیص این ویروس، حتی در تیتراژ بالای ۱۰۰۰ کپی در میلی‌لیتر، یافتن راهی برای تکثیر حساس و اختصاصی این ویروس، یک نیاز اساسی است (۲۳).

Touch Down PCR روشی است که در آن واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران ابتدا از دمای بالا شروع می‌شود و در ادامه به تدریج دمای اتصال کاهش می‌یابد، بدین ترتیب در دمای بالای اولیه که اتصال پرایمر به ناحیه غیر اختصاصی دشوار می‌باشد فقط محصول خالص اولیه تولید می‌شود و در نتیجه چون قطعه اختصاصی اتصال پرایمر در محیط واکنش به

نسبت خیلی بیشتر می‌باشد، حتی با پایین آمدن دما در ادامه کار، شانس اتصال به نواحی غیر از نواحی اصلی اتصال اصلی بسیار کم می‌شود (۱۸). ثابت شده است که تمامی مشکلات مربوط به اتصال نامناسب پرایمر به آسانی به وسیله کاهش تدریجی دمای اتصال برطرف می‌شوند. این روش تنها به توالی‌های بسیار اختصاصی و همراه با افزایش حساسیت و کارایی اجازه تکثیر می‌یابد (۲۴).

یک روش فرعی سریع برای اجرای پروسه‌های وقت‌گیر بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران می‌تواند استفاده از کاهش مرحله‌ای دمای اتصال پرایمرها در واکنش تا حدود دمای اتصال استاندارد و اتصال به صورت تدریجی باشد. مطالعه‌های متعددی قدرت عملکردی Touchdown PCR را تأیید کرده‌اند (۲۶ و ۲۴، ۲۱، ۱۸). Touchdown PCR یکی از انواع استاندارد تغییرات ایجاد شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران است که باعث افزایش حساسیت و اختصاصیت واکنش می‌شود (۲۴). این روش یک پروسه یک مرحله‌ای ساده و سریع برای بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران به منظور افزایش اختصاصیت در زمانی است که دمای اتصال پرایمر به الگو دقیقاً معلوم نیست (۲۱، ۱۸).

کوچک‌ترین اختلاف بین دمای درست و نادرست اتصال پرایمر، قادر به ایجاد اختلافی در حد دو برابر است که در هر سیکل به طور تصاعدی افزایش می‌یابد. Touchdown PCR کاربردهای زیادی در پروتکل‌های استاندارد واکنش زنجیره‌ای پلی‌مران از

قبیل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس معکوس^(۱) برای ساخت کتابخانه‌های cDNA و غربالگری SNP ها پیدا کرده است. Touchdown PCR به طور اختصاصی برای نمونه‌هایی مفید است که تکثیر آنها مشکل است، اما به طور معمول برای افزایش حساسیت و تشکیل محصولات نیز به کار می‌رود(۱۸).

در مطالعه حاضر علی‌رغم شکل‌گیری باندهای ناخواسته در واکنش استاندارد، با اجرای پروسه Touchdown بدون این که اثر منفی در میزان محصول نهایی ایجاد شود باند اضافی حذف شد.

با توجه به سادگی این روش و نیز عدم ایجاد هزینه و مراحل کاری اضافی به نظر می‌رسد که استفاده از این پروتکل برای بهینه‌سازی سریع واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراس، روشی منطقی و به صرفه باشد. توصیه می‌گردد در حالت برخورد با باندهای ناخواسته‌ای که با روش‌های معمول بهینه‌سازی حذف نمی‌شوند، استفاده از این پروسه قادر به رفع مشکل و حذف باندها از یک مسیر سریع و با صرفه خواهد بود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و همچنین کمیته تحقیقات دانشجویی که در انجام پژوهش حمایت مالی و معنوی نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

Evaluation of Touchdown Nested PCR to Circumvent Spurious Priming and Increase Specificity during HIV and GBV-C Gene Amplification

Falahi SH*,
Ravanshad M**,
Kenarkohi O*,
Ghanbari R,
Haji Abdolbaghi M***.

*MSc in Virology, Department of Virology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

** Assistant Professor of Virology, Department of Virology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*** Professor of Infectious Disease Division, Department of Infectious Disease Division, Emam Khomani Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received:08/12/2009
Accepted:03/01/2010

Corresponding Author: Ravanshad M
Email: Ravanshad@modares.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Primer-Template hybridization temperature is one of the important parameters in Nested PCR optimization. Unlike instant temperature for sequence amplification in routine PCR process, Touchdown PCR is a modified form of standard PCR that employs a range of annealing temperature. This study intended to develop a Touchdown Nested PCR in order to circumvent spurious priming and enhancing specificity during gene amplification.

Materials & Methods: This is an experimental study conducted at Tarbiat Modarres University of Tehran during 2008-2009. Study samples were collected from Digestive Diseases Research Centre-at Shari'ati Hospital and HIV research center – Imam Khomeini Hospital. After extracting the nucleic acid, primer designing for HIV and GBV-C and c-DNA synthesis; Nested PCR was performed on negative and positive samples using standard and touchdown protocols.

Results: The intended band was observed in all positive samples. No band was observed in any human and viral negative control samples. After electrophoresis of PCR products, non specific band were seen in HIV and GBV-C samples during standard PCR. Using the touchdown protocol, undesirable bands were omitted or significantly decreased.

Conclusion: In the present study, despite the formation of uncalled bands in standard reaction; using the touchdown method led to omission of non-specific bands without any significant effect on the final products. As for its simplicity, cost and time saving, it seems that using this method is a rational and economical way for fast optimization of PCR reactions.

Keywords: Touchdown Nested PCR, spurious priming, specificity, gene amplification

REFERENCES:

1. Bhat HK, Epelboym I. Quantitative analysis of total mitochondrial DNA: competitive polymerase chain reaction versus real-time polymerase chain reaction. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2004;18(4): 180–6.
2. Imagawa DT, Lee MH, Wolinsky SM, Sano K, Morales F, Kwok S, et al. Human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods. *New England Journal of Medical Science* 1989; 320: 1458–62.
3. Gaspar JO, Belintani P, Almeida AMR, Kitajima EW. A degenerate primer allows amplification of part of the 3'-terminus of three distinct calvarivirus species. *Journal of Virological Methods* 2008; 148: 283–5.
4. 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.
5. 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(2): S381–6.
6. 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.
7. Llop P, Bonaterra A, Penalver J, Lopez 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* 2002; 66:2071–8.
8. Hamburger JXY, Ramzy RM, Jourdane J, Ruppel A. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring *Schistosoma mansoni* infestation of water. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59:468–73.
9. Hamburger J, Ramzy RM, Jourdane J, Ruppel A. Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: a potential tool for monitoring schistosome-infested water. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 907–11.
10. Meng Q, Rangachari A, Tamatsukuri M, Fliss E, Cheng L, Fiss E, et al. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of Hepatitis B virus, Hepatitis C virus RNA and Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(8):2937–45.
11. Coutlee F, Bobo L, Mayur K, Yolken R, Viscidi R. Enzyme immuno assay for detection of hybrids between PCR amplified HIV-1 DNA and RNA probe: PCR-ELA. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1990; 6(6):775–84.
12. Albert JFE. Simple sensitive, and specific detection of Human Immunodeficiency Virus type 1 in clinical specimen by polymerase chain reaction with PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28(7): 1560–4.
13. Schmunis GA, Pinheiro F, Brandling-Bennett D. Risk of transfusion-transmitted infectious diseases in central and south America. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(1): 5–11.
14. McPherson MJ, Moller S, Graham A. PCR; The Basics Bios, Scientific Publishers Ltd 2000; 2: 15.
15. Ziaeean M, Sabahi F, Alborzi A, Mahboodi F, Karimi M, Tahvildari PB. Development of a sensitive quantitative competitive PCR assay for detection of human cytomegalovirus DNA. *Iranian Biomedical Journal* 2005;9(4):187–91.
16. Cindy Christopherson JS. The effects of internal primer–template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies. *Nucleic Acids Research* 1997; 25: 654–8.
17. Don HR, Cox TP, Wainwright JB, Baker K, Mattick SJ. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 1991; 19(14): 4008.
18. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 2008; 3(9): 52–6.
19. De la Horra C, Varela JM, Friaza V, Respaldiza N, Muñoz-Lobato F, Montes-Cano MA, et al. Comparison of single and touchdown PCR protocols for detecting *Pneumocystis jirovecii* DNA in paraffin-embedded lung tissue samples. *J Eukaryot Microbiol* 2006; 53(1): S98–9.
20. Suzuki T, Osada Y, Kumagai T, Hamada A, Okuzawa E, Kanazawa. Early detection of *Schistosoma mansoni* infection by touchdown PCR in a mouse model. *Parasitol Int* 2006; 55(3): 213–8.
21. Huang XQ, Cloutier S. Hemi-nested touchdown PCR combined with primer-template mismatch PCR for rapid isolation and sequencing of low molecular weight glutenin subunit gene family from a hexaploid wheat BAC library. *BMC Genet* 2007; 8:18.

22. Coyle PV, Ong GM, Neill HJO, McCaughey C, Ornellas DD, Mitchell F. A touchdown nucleic acid amplification protocol as an alternative to culture backup for immunofluorescence in the routine diagnosis of acute viral respiratory tract infections. *BMC Microbiology* 2004; 4:41.
23. Asagi TIS, Kaneda T, Suzuki H, Tezuka F, Nishimura H. RT-nested touchdown PCR is an effective method for gene amplification in genotypic analysis of drug-resistant HIV-1. *Int Conf AIDS*. 2002; 7-12; 14.
24. Woźniakowski G, Kozdruń W, Samorek-Salamonowicz E, Król K. Touchdown PCR for the Detection of Waterfowl Parvoviruses. *Bull Vet Inst Pulawy* 2009; 53: 3-7.
25. Cloutier X. Hemi-nested touchdown PCR combined with primer-template mismatch PCR for rapid isolation and sequencing of low molecular weight glutenin subunit gene family from a hexaploid wheat BAC library. *BMC Genetics* 2007; 8(18).
26. Helmy MM. Touchdown PCR, ELISA and stool examination for early diagnosing of *Schistosoma mansoni* in mice. *J Egypt Soc Parasitol* 2007; 37(3): 903-13.