جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

کاربردهای روش LAMP در تشخیص‌های بالینی

زهرا کاردوست پاریزی[۱]، نسیم قربانمهر[۲*]، ریحانه رمضانی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا (س)، تهران

۲- عضو هیئت علمی دانشگاه الزهرا (س)، تهران

چکیده

بررسی کاربردهای روش LAMP در تشخیص زودهنگام و دقیق عوامل بیماریزا است. تکنیک (loop-mediated isothermal LAMP amplification)؛ روش تکثیر اسید نوکلئیک است که به دلیل ویژگیهای خاصش مورد توجه محققان قرارگرفته است. طراحی خاص ساقه – حلقه پرایمرها، ویژگی strand displacement آنزیم Bst DNA Polymerase و استفاده از رنگ‌های واکنش دهنده با DNA این روش را از تجهیزات ترموسایکلر و الکتروفورز بی نیاز نموده است. دقت تشخیص بالای این روش و ویژگیهای نامبرده باعث برتری آن به تکنیک PCR شده وآن را یک انتخاب مناسب برای آزمایشگاه‌های فاقد تجهیزات، در مناطق محروم و در شرایط بحران نموده است. اخیراً مطالعات بسیاری در زمینه کاربرد این روش در تشخیص انواع بیماری‌ها صورت گرفته و در حال انجام است. هدف این مطالعه بررسی تحقیقات انجام شده درراستای کاربرد این روش در تشخیص بالینی، یافتن خلاء موجود برای طراحی مطالعات آینده و امکان کاربردی کردن آن در کشور بود. مطالعه حاضر نشان داد که از سال ۲۰۱۱ مطالعات بسیاری درراستای کاربرد این روش در موارد زیر صورت گرفته است: ۱-تشخیص باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت ۲- تشخیص ویروس‌های دارای RNA و DNA ۳- تشخیص میکروارگانیسم‌های قارچی ۴- تشخیص انگل‌های بیماریزا مانند تریپانزوما و پلاسمودیوم ۵- تشخیص مایکوپلاسماها ۶- تشخیص DNA اصلاح شده‌ی GMO ها ۷- تشخیص تومورها و متاستاز از نمونه بیوپسی بیماران. با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر این روش قابلیت تشخیص طیف وسیعی از عوامل بیماریزا را داشته و به نظر می‌رسد که در آینده نزدیک بتواند در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به عنوان یک روش رایج مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: LAMP، تکثیر همدما، کاربردها، عوامل بیماری زا

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

تعریف LAMP (Loop-mediated isothermal AMPlification) تکثیر همدما به واسطه حلقه

یک روش نسبتاً جدید برای تکثیر DNA با اختصاصیت، حساسیت و سرعت بالا می‌باشد که در شرایط همدما انجام می گیرد.

دراین روش از آنزیم Bst DNA Polymerase استفاده می‌شود. که معمولاً این آنزیم از باسیلوس استرئوترموفیلوس *Bacillus stearothermophilus* استخراج می‌شود؛ این آنزیم دارای خاصیت strand displacement می‌باشد و در شرایط همدما منجر به تکثیر DNA هدف می‌شود. در این روش ۴-۶ پرایمر طراحی می‌شود که به طور اختصاصی قادر به تشخیص ۶ تا ۸ ناحیه روی DNA هدف می‌باشد و این موضوع باعث اختصاصیت بسیار بالای این روش شده است.

تاریخچه:

روش LAMP اولین بار در سال ۲۰۰۰ توسط نوتومی و همکارانش به عنوان یک روش جایگزین برای PCR و دیگر روش‌های ملکولی گزارش شد. روش LAMP تا سال ۲۰۰۸ مورد استقبال قرار نگرفت. اما از سال ۲۰۰۸ به بعد به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفت. به طوری که تا سال ۲۰۱۲ در حدود بیش از ۷۵۰ مقاله زمینه‌های مختلف بالینی، کشاورزی، بهداشت و غیره منتشر شد.

مواد و روش‌ها:

مزیت‌های روش LAMP:

۱- سادگی و ارزان قیمت بودن:

الف) شرایط انجام واکنش به صورت همدما می‌باشد و نیاز به دستگاه ترموسایکلر ندارد.

ب) همه معرف‌های مورد نیاز برای تشخیص تقریباً ارزان قیمت است.

ج) آزمایشات در مراحل بعدی احتیاج به دستکاری بیش از حد ندارد.

۲- اختصاصیت بالا: از آنجایی که تعداد پرایمر ها زیاد است اختصاصیت نسبت به PCR بیشتر است. واکنش LAMP کمتر مستعد تداخلات بوده و تقریباً در حدود ۱۰۰٪ اختصاصی عمل می کند.

۳- حساسیت نسبتاً بالا: گزارشات نشان می‌دهد حساسیت روش LAMP حدود ۱۰ برابر بیشتر از حساسیت PCR است.

استفاده مستقیم از نمونه: جایی که عامل مورد نظر ایجاد عفونت کرده است مانند خون، سرم، ادرار و غیره در روش PCR و دیگر روش‌های ملکولی نیاز به شرایط ایزوله از اسیدهای نوکلئیک می‌باشد. اما در طول LAMP این امکان وجود دارد که نمونه مستقیماً از غذا، ادرار، خون، سرم و غیره برداشته شود.

کاربرد روش LAMP:

۱- کاربرد در تشخیص میکروارگانیسم‌های بیماری زا:

تشخیص باکتری‌های پاتوژن: روش‌های مختلف زیادی وجود دارد که قادر به تشخیص و شناسایی باکتری‌ها می‌باشد. اما این روش‌ها مشکلاتی دارند؛ از جمله آن‌ها جواب مثبت کاذب و یا تشکیل پرایمر-دایمر می‌باشد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

روش LAMP به عنوان یک روش برای تشخیص انواع میکروارگانیسم‌ها به کار می‌رود. این روش ساده، با اختصاصیت بالا، سریع و مقرون به صرفه می‌باشد. با توجه به ایجاد شرایط با نفوذ پذیری کم، درجه حرارت پایین، همدما بودن این روش سبب شده که آسیب وارد شده بر باکتری، نسبت به PCR کمتر شود.

تا کنون از این روش برای تشخیص بسیاری از باکتری‌ها اعم از باکتری‌های گرم مثبت (مانند *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes*، *Bacillus cereus*، *Clostridium botulinum and C. perfringens* و *Alicyclobacillus acidoterrestris*) و باکتری‌های گرم منفی (مانند *Escherichia coli*، Salmonella و انواع Vibrio) استفاده شده است.

تشخیص ویروس‌های پاتوژن: روش‌های مختلفی برای تشخیص ویروس‌ها وجود دارد از آن جمله روش‌های بیوشیمیایی، سرولوژیکی PCR، روش‌های مبتنی بر پروب اسید نوکلئیک وغیره را می‌توان نام برد. با این حال، زمان و تخصص مورد نیاز در شرایط دشوار امکان پذیر نیست؛ با توجه به این موضوع روش LAMP می‌تواند به طور سریع با حساسیت مناسب و اختصاصیت بالا و طور گسترده ای در شناسایی RNA و DNA ویروسی بپردازد. برای مثال ویروس حلقه ای در برگ زرد گوجه فرنگی، پاروویروس خوکی (PPV)، ویروس تبخال انسانی (HSV-6) بدون نیاز به استخراج DNA، انواع هرپس ویروس‌های انسانی و همینطور ویروس آنفلوانزا این روش موفقیت آمیز بوده است. ویروس‌های RNA دار نیز با این روش و با کمک RT-LAMP قابل شناسایی می‌باشد. مانند ویروس موزائیک سیب زمینی و TSV که در مقایسه با RT-PCR حدود ۱۰ برابر حساس تر است.

تشخیص میکروارگانیسم‌های قارچی: روش LAMP در تشخیص میکروارگانیسم‌های قارچی نسبت به دیگر روش‌ها مثل کشت بیولوژیکی و آزمون آسیب شناسی دارای سرعت و سادگی بیشتری است.

از جمله قارچ‌هایی که با این روش تشخیص داده شده می‌توان Paracoccidioides brasiliensis را نام برد.

تشخیص انگل‌های بیماری زا: از جمله انگل‌های قابل تشخیص با LAMP، می‌توان تریپانزوما، پلاسمودیوم، بابزیا و غیره را نام برد.

تشخیص مایکوپلاسما: روش‌های تشخیص مایکوپلاسما مثل کشت، روش‌های سرولوژیکی و تشخیص آنتی ژن وجود دارد که هزینه بر و وقت گیر است. اما با روش LAMP، مایکوپلاسما پنومونیه و دیگر مابکوپلاسما ها با سرعت و هزینه‌ی کمتر قابل تشخیص می‌باشد.

کاربرد در تشخیص اجزای اصلاح شده ژنتیکی: روش‌های بسیاری در تشخیص GMO ها گسترش یافته، از این جمله LAMP نیز می‌باشد. یکی از این نمونه‌ها، ژن پروموتور ویروس موزائیک گل کلم (35s) می‌باشد که از روش LAMP، در تکثیر DNA مربوط به GMO ها استفاده می‌شود. محصولات آن را نیز با چشم غیرمسلح و با بکارگیری سایبرگرین روی ژل الکتروفورز را می‌توان تشخیص داد.

۲- کاربرد در تشخیص تومورها:

این روش سریع و دقیق برای تشخیص متاستاز از نمونه بیوپسی بیماران مبتلا به سرطان معده و با استفاده از روش RT-LAMP قابل شناسایی می‌باشد. با این روش ژن سیتوکراتین ۱۹ (CK19) تکثیر یافته و تشخیص داده می‌شود. روش RT-LAMP نشان دهنده

حساسیت بالاتر و ساده تر از روش Nested RT-PCR در تشخیص متاستاز بوده و با سرعت اتفاق می‌افتد. این روش با بررسی آسیب شناسی حین عمل به روش برش منجمد رنگ آمیزی هماتوکسین ائوزین قابل مقایسه است.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان داد که روش LAMP، یک تکنیک جدید و ساده برای تشخیص عوامل ژنتیکی زیادی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به نظر می‌آید این روش یک جایگزین مناسب برای روش‌های ملکولی دیگر از جمله PCR و Real-time PCR در موارد تشخیصی باشد. از آنجایی که این روش صرفه اقتصادی بیشتری دارد و روش‌های ردیابی محصول سریع‌تر و ساده تر می‌باشد؛ می‌تواند به طور گسترده در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مورد استفاده قرار بگیرد. استفاده از این روش خصوصاً در شرایط بحران مانند سیل و زلزله و همین طور کشورهای در حال توسعه با امکانات آزمایشگاهی کمتر یک روش مفید برای تشخیص دقیق و حساس عوامل بیماری زا می‌باشد.

با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر این روش قابلیت تشخیص طیف وسیعی از عوامل بیماریزا را داشته و به نظر می‌رسد که در آینده نزدیک بتواند در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به عنوان یک روش رایج مورد استفاده قرار گیرد.

با طراحی کیت‌های تشخیصی روشLAMP ، می‌توان با سرعت و حاسیت بالاتر به تشخیص عوامل بیماری زا پرداخت؛ خصوصاً در مناطقی که بیماری‌های بومی عفونی زیاد هت و تشهیص طود هنگام این گونه بیماری عا می‌تواند از مرگ و میر تعداد زیادی از انسان‌های مبتلا جلوگیری کند.

در نهایت امید بر این است که طراحی کیت‌های تشخیصی در این زمینه به زودی بتواند بومی شود و به طور گسترده در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

Chander, Y., and et al. 2014. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Forntiers in Microbiology.

Fu, S., and et al. 2010. Applications of Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification. Polish Appl Biochem Biotechnol. 163:845–850

Niessen, L., and et al. 2013. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. Polish Elsevier Ltd. Food Microbiology

Notomi, T., and et al. 2000. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. Nucleic acid Research

Saharan, P., and et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: a Review. African Journal of Biotechnology. 13(19): 1920-1928