

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 فلاحتی^۱، مهرداد روانشاد^{۲*}، عذران کنارکوهی^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

دریافت مقاله: ۸۸/۰۹/۰۸ پذیرش مقاله: ۸۸/۱۲/۱۷

چکیده

هدف: واکنش زنجیر پلیمراز یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌ها در زمینه زیست‌شناسی و تشخیص مولکولی است. با وجود سادگی در مفهوم این روش نیازمند کنش‌های پیچیده بین توالی هدف، آغازگرهای dNTP و آنزیم پلیمراز 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 آلدگی‌های احتمالی خواهد شد. هدف از مطالعه حاضر راهاندازی و به کارگیری 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 اینمی اکسایبی انسان، هپاتیت G و تورکوتونو انجام گردید. براساس نتایج به دست 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 هیچ یک از نمونه‌های کنترل منفی باند مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: براساس سیستم ویژه طراحی آغازگر که در مطالعه حاضر استفاده شد، آغازگرهای داخلی به صورت 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 آلدگی به دلیل یک مرحله‌ای شدن و علاوه بر آن، کوتاه‌تر شدن زمان واکنش و نیز کاهش هزینه‌ها است.

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

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی پزشکی، کد پستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶

Email: Ravanshad@modares.ac.ir

آغازگر، اختصاصیت و حساسیت PCR بالا می‌رود، این امر اساس روش Nested PCR را تشکیل می‌دهد. اما ایجاد آلدگی متقطع در تکثیر مرحله دوم به سیله محصولات دور اول مهم‌ترین عامل ایجاد نتایج مثبت کاذب و کاهش اعتماد به این روش است. پدیده ایجاد آلدگی 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 [۱۲، ۱۱، ۷]. جلوگیری از ایجاد جواب‌های کاذب به علت ایجاد آلدگی 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 آلدگی، به دلیل انتقال مواد واکنش دور اول به لوله جدید به منظور اجرای دور دوم PCR است. ترکیب واکنش‌های مرحله یک و دو در واکنش Nested PCR به روش‌های مختلف برای کاهش آلدگی گزارش شده است [۱۳-۱۷]. استفاده از دمای‌های اتصال مختلف و انجام آزمایش به صورت یک مرحله‌ای- یک لوله‌ای، از این روش‌هاست [۹، ۱۰، ۱۴]. روش دیگر جداسازی فیزیکی آغازگرها و دیگر مواد افروزنی مورد نیاز برای واکنش دوم از مواد واکنش دور اول در یک لوله بدون انتقال به لوله دوم است [۱۵، ۲۰-۲۱].

هدف از این مطالعه راهاندازی یک روش جدید سریع و حساس Nested PCR یک مرحله‌ای- یک لوله‌ای در سیستم استه با استفاده از دو آغازگر به هم چسبیده، برای اولین بار است؛ به طوری 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 آلدگی متقطع از منابع داخلی و خارجی است.

۲- مواد و روش‌ها

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

۱- مقدمه

پیشرفت‌های دو دهه اخیر در زمینه زیست‌شناسی مولکولی موجب ارتقای کارآیی و تکامل هر چه بیشتر آزمایش‌های وابسته به اسیدنوکلئیک در علوم بالینی شده است. استفاده از نشانگرهای (Markers) غیر رادیواکتیو و اولیگونوکلوتیدهای مکمل با ژن‌ها یا مترادف‌های ویژه بازهای آلتی در DNA از جمله پیشرفت‌های مؤثر در بهبود و به کارگیری روزافزون آزمون‌های وابسته به DNA در طیف تشخیص بالینی محاسب می‌شود. یکی از مهم‌ترین پیشرفت‌ها در زمینه زیست‌شناسی مولکولی که در عین حال کاربرد تشخیصی نیز دارد، واکنش زنجیر پلیمراز (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 (Primers) به صورت 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 کفايت می‌کند و معمولاً از آغازگرهای بیش از ۳۰ نوکلوتید 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 کمی‌های بسیار کم ذنوم ویروس در نمونه‌های بیماران باشد [۸]. رسیدن به این سطح از حساسیت امروزه به عنوان 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 به صورت Nested PCR تا حدی منجر به بهبود حساسیت تشخیص شده است [۹-۱۱]. در این روش با استفاده از دو جفت

ویروس HCV قرار دارند. طول ژن UTR در ژنوتیپ‌های مختلف از ۳۰۰-۳۵۰ باز است. آغازگرها اختصاصی براساس هم‌ردیفی توالی‌های UTR (شکل ۱) از پایگاه GenBank با استفاده از نرم‌افزار Clustal W طراحی شد. این آغازگرها قادر به تکثیر ناحیه ۲,۳,۳a, ۱j, ۱c, ۱b, ۱a, ۶k, ۶j, ۶i, ۶h, ۶g, ۶f, ۶e, ۶d, ۴,۵,۶,۶a, ۳k, ۳b ویروس HCV ژنوتیپ‌های ۶p, ۶n, ۶o, ۶m, ۶l, ۶m ویروس، آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که سویه‌های ویروسی شایع در ایران را با دقت بیشتری تشخیص دهند. آغازگرها حاصل از بین طیف آغازگرها طراحی شده با توجه به ویژگی‌های مورد نظر انتخاب شد. از نرم‌افزارهای Mega 4, Gen Runner, Oligo6, Oligo Analyzer تجزیه و تحلیل خصوصیات آغازگرها طراحی شده نظیر طراحی آغازگر، تعیین خصوصیت توپولوژیک (Topologic) و ترمودینامیک (Thermodynamic) آنها استفاده شد. طول قطعه ایجاد شده توسط آغازگرها خارجی ۲۰۰ جفت‌باز و طول قطعه ایجاد شده توسط آغازگرها داخلی ۱۱۰ جفت‌باز است.

مراجعه کننده به مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی 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 پلاسمما، نمونه‌ها به آزمایشگاه HIV (Human Immunodeficiency Virus) و هپاتیت گروه ویروس‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس منتقل و در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده ذخیره شد. RNA ویروس از ۱۴۰ میکرولیتر پلاسمما با استفاده از کیت (QIAamp Viral RNA mini kit, QIAGEN) استخراج کیاژن RNA استخراج شد. اجرای این تحقیق به تصویب کمیته‌های اینمنی زیستی و اخلاقی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسید. فرم رضایت‌نامه برای کلیه بیماران شرکت کننده در تحقیق تهیه شده بود.

۱-۲- طراحی آغازگر

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

جدول ۱ ویژگی‌های کلی آغازگرها طراحی شده

نام آغازگر	GC	درصد GC	دماز 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	-	-	-	-	TTTTTTTT

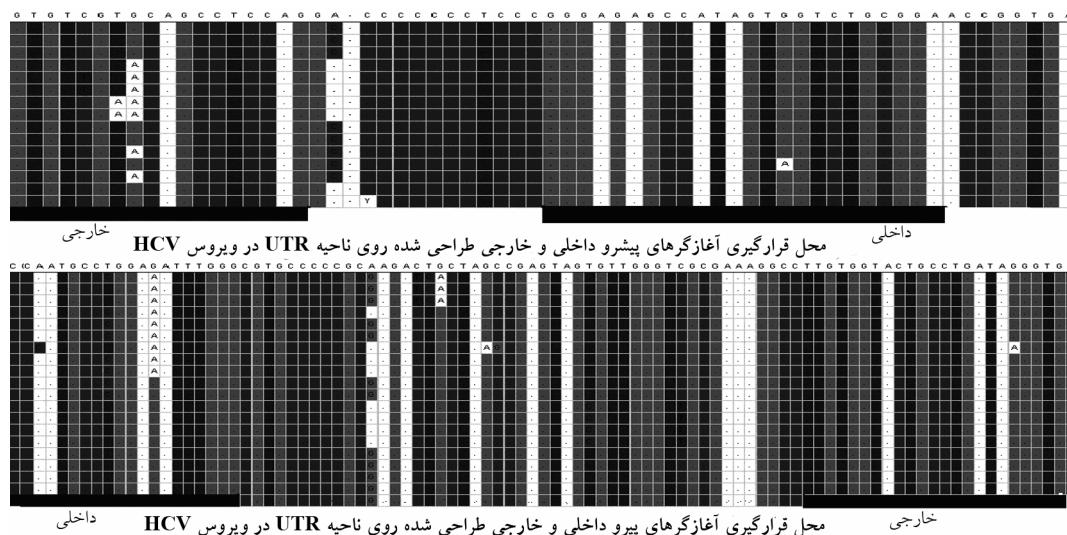
جدول ۲ توالی آغازگرها به صورت مورد استفاده در آزمایش

5'-TTC CGC AGA CCA CTA TGG CTC TCC C TTTTTTTT GTG TCG TGC AGC CTC CAG-3'

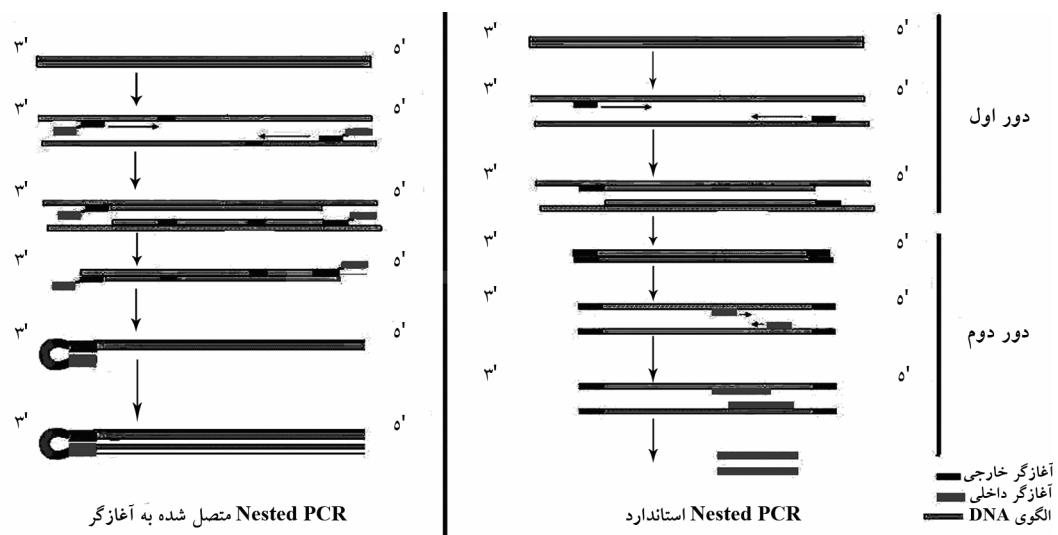
آغازگرها مورد استفاده پیشرو در انجام آزمایش

5'-CCT GGA GAT TTG GGC GTG CCC TTTTTTTT CAC CCT ATC AGG CAG TAC CAC AA-3'

آزمایش های مورد استفاده پیرو در انجام آزمایش



شکل ۱ محل قرارگیری آغازگرهای طراحی شده روی زنوم HCV



شکل ۲ مقایسه شماتیک روش راهاندازی شده و Nested PCR

و الیگونوکلئوتید 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 به صورت صحیح، توالی نوکلئوتیدی به صورت مکمل حالت معمول ساخته شد. آغازگر پیشرو از

۲-۲- ترکیب آغازگرهای

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

۲-۴- بهینه سازی و اکنش، Nested PCR

هنگامی که هدف بهینه‌سازی غاظت اجزا و شرایط یک واکنش باشد، یک روش تجربی آزمون و خطا به کار گرفته می‌شود، چرا که هیچ روشی برای پیش‌بینی کارایی ویژگی‌های انتخاب شده و حد نداد [۲۱].

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

جدول ۳ خلاصه شرایط PCR انجام شده

مرحله	دما	زمان
جدا شدن اولیه دو رشته	۹۰ درجه سانتی گراد	۵ دقیقه
جدا شدن دو رشته	۹۰ درجه سانتی گراد	۵ ثانیه
دو رگه شدن آغازگر و الگو	۶۵-۶۲ درجه سانتی گراد	۴ ثانیه
پیشروی	۷۲ درجه سانتی گراد	۵ ثانیه
تعداد چرخه	-	۴
پیشروی نهایی	۷۲ درجه سانتی گراد	۷ دقیقه

بعد از بهینه‌سازی واکنش، بهترین شرایط PCR در حجم ۲۵ میکrolیتر، شامل ۱۵۰ نانوگرم از DNA الگو، آغازگرهای پیشرو و پیرو هر کدام با غلظت نهایی ۰/۲ پیکوگرم، ۵ میکرومول مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مول)، Taq DNA پلیمراز با غلظت نهایی ۴ واحد بین‌المللی، یک میکروولیتر از MgCl₂ (۱۰ میلی‌مول) و ۲/۵ میکروولیتر از بافر PCR با غلظت اولیه (Fermentas) تعیین شد. واکنش تکثیر تحت شرایط دمایی: واسرتی 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 ۶۵-۶۶ درجه سانتی‌گراد و ۵۰ ثانیه در ۷۷ درجه سانتی‌گراد و در پایان ۷ دقیقه در ۷۷ درجه سانتی‌گراد به عنوان گسترش، نهایاً فرار گرفت (جدول ۳). در مرحله آخر محصول

ناحیه مکمل الیگونوکلئوتید داخلی پیرو، ناحیه لولا و الیگونوکلئوتید 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 به منظور 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

استخراج شده بلا فاصله برای واکنش رونویسی RNA معکوس به کار گرفته شد. DNA مکمل (cDNA) با استفاده از یک محلول واکنش شامل آنزیم پلیمراز M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) و آغازگر های خارجی پیرو طبق دستور العمل (Promega) شرکت سازنده با کمی تغییرات به منظور بهینه سازی شرایط برای آزمایش، ساخته و تکثیر شد. برای اجرای تحقیق ۵ میکرو لیتر از RNA (حدود ۱۵۰ نانو گرم) به محلول واکنش در یک میکرو تیوب حاوی آغازگر اختصاصی پیرو با غلظت نهایی ۰/۴ پیکومول اضافه شد که به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت، سپس ۴ میکرو لیتر از بافر X، ۱۰ مخلوط dNTP (۱۰ میلی مول) با غلظت نهایی ۰/۸ پیکو گرم RNase (Fermentas) و نیم میکرو لیتر از ممانعت کننده آنزیم RNase Inhibitor (RNase Inhibitor) (۲۵ واحد) (غلظت نهایی ۰/۵ واحد) اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. در مرحله آخر بعد از افزودن یک میکرو لیتر از M-MLV (۲۰۰ واحد) (غلظت نهایی ۸ واحد) به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد (Promega) قرار گرفت.

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

نتایج به دست آمده					
نمونه مورد مثبت منفی کاذب	مثبت کاذب	مثبت واقعی	منفی واقعی	مطالعه	
۲	·	·	·	۴۸	کنترل مثبت
·	·	۵	·		کنترل منفی
·	·	۵	·		HIV
·	·	۵	·		HBV
·	·	۵	·		HGV
·	·	۵	·		TTV
۲	·	·	۳۰	۴۸	مجموع
			۹۷/۵	(۱۰۰ درصد)	(۹۶ درصد) (۲/۵ درصد)

در ۴۸ مورد از ۵۰ نمونه مثبت باند مورد نظر مشاهده شد. در هیچ یک از نمونه‌های کنترل منفی انسانی و ویروسی هیچ باند مشاهده نشد. در نمونه‌های مثبت باند غیراختصاصی مشاهده نشد. در نمونه‌های مثبت پس از الکتروفوروز محصولات PCR دو تا سه باند با فاصله حدود ۵۰ باز مشاهده شد و در نمونه‌های کنترل منفی این باند مشاهده نمی‌شد. آغازگرهای طراحی شده در این مطالعه براساس تجزیه و تحلیل‌های انجام گرفته با نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک قادر به تشخیص ژنتیک‌های ۱a، ۱b، ۱c، ۱j، ۲,3,3a، ۳k، ۳b، ۶n، ۶l,6m، ۶k، ۶j، ۶i، ۶h، ۶g، ۶f، ۶e، ۶d، ۶b، ۴,5,6,6a و ۶p ویروس HCV هستند.

۱-۳- مقایسه روش راهاندازی شده با روش

Nested PCR معمولی

به منظور مقایسه روش راهاندازی شده با روش Nested PCR معمولی از یک سری آغازگر دیگر در مطالعه شاهزمانی و همکاران استفاده شد که توالی آنها به صورت آغازگر خارجی پیشرو: ۵'-AGC GTC TAG CCA TGG CGT-3' خارجی پیرو: ۵'-GCA CGG TCT ACG AGA CCT-3' داخلی پیشرو: ۵'-GTG GTC TGC GGA ACC GG-3'

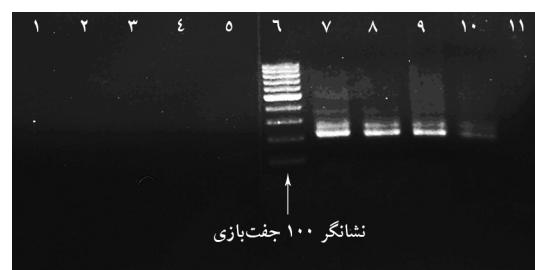
PCR توسط الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد جداسازی و توسط رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید (Ethidium bromide) در حضور نور اشعه ماورای بنفش آشکارسازی شد.

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- نتایج

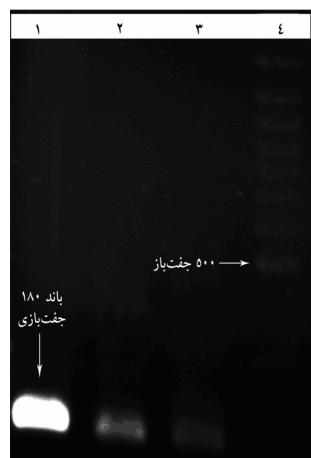
پس از بهینه‌سازی اجزای واکنش (شکل ۲ و ۳)، روش طراحی شده روی ۵۰ نمونه مثبت HCV، ۱۰ کنترل منفی ژنوم انسانی و ۵ نمونه از هرکدام از ویروس‌های HIV، HBV، HGV، Hepatitis G Virus: HGV (هپاٹیتیت G) و ویروس تورکوتنو (Totque Teno Virus: TTV) (با عنوان کنترل منفی ویروسی) انجام شد. براساس نتایج به دست آمده از مجموع 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) کنترل منفی ویروسی، ۵) کنترل منفی انسانی، ۶) نشانگر اندازه DNA آزمایش در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد، ۷) 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 [۶، ۵، ۲۲]. هنگامی که از دماهای مختلف برای اتصال آغازگرهای پیرو و پیشو و 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 پیشو 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 آلدگی 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^۱: GGG CAC TCG CAA CCC-3' است. لازم به ذکر است که شرایط انجام واکنش نیز مانند شرایط گزارش شده در مقاله شاهزمانی 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 ۲، (۲) نمونه ۳، (۳) نمونه ۴) نشانگر ۱۰۰ جفت باز

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 [۱۴، ۹، ۱۰]. 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. هر کدام 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]. 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. به طور خلاصه روش جدید، بسیار آسان و مؤثر ارایه و به طور موفقیت‌آمیز برای تشخیص HCV از نمونه‌های پلاسمای انسانی ارزیابی شد. به نظر می‌رسد روش مورد بحث، می‌تواند برای تشخیص حساس و سریع دیگر ویروس‌ها به کار گرفته شود.

۵- تشكر و قدردانی

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

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

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 نتوانند 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 (Loop mediated Isothermal Amplification) LAMP 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 به طور 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* پلیمراز است، به نظر می‌رسد که روش طراحی شده مناسب و دارای صرفه اقتصادی بیشتری است. با یک مقایسه کلی مشخص می‌شود که عملده‌ترین روش‌ها برای یک مرحله‌ای کردن یک واکنش Nested، استفاده از آغازگرهای داخلی و خارجی با دمای واسرشنی (Tm) 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 Tm بالاتر از دمای اتصال آغازگرهای داخلی در روش اول یا به دلیل احتمال نشت

۶- منابع

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. *Biochimstry* 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, Ibata 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.