مجله علوم پزشکی مدرس
دوره ۱۱، شماره ۱ و ۲: از ۹۹-۱۰۷
بهار و تابستان ۱۳۸۷

به‌کارگیری روش PCR-ELISA با استفاده از ترادف RE در تشخیص کمی توکسوپلاسموز تجربی در مدل موشی (*Rattus norvegicus*)

رقیه نوروزی[۱]، عبدالحسین دلیمی[۲]، مهدی فروزنده[۳]، فاطمه غفاری‌فر[۴*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۳

چکیده

هدف: توکسوپلاسما ممکن است ایجاد آسیب در جنین و از انگل‌های فرصت‌طلب در بیماران با ایمنی سرکوب شده است. استفاده از روش‌های مولکولی برای تشخیص بیماری حساس‌تر از روش‌های سرولوژیک است. استفاده از روش PCR-ELISA حساسیت و ویژگی بالا، زمان تشخیص توکسوپلاسموزیس نیز سریع‌تر است.
در این پژوهش از روش PCR-ELISA با استفاده از قطعه RE DNA، برای تشخیص توکسوپلاسموزیس به‌کار رفت. از مزایای این روش حساسیت و اختصاصی بودن و در نهایت تشخیص سریع توکسوپلاسموزیس است.
مواد و روش‌ها: در این مطالعه از روش کمی PCR-ELISA برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در ۱۵ سر رت استفاده شد. بدین منظور PCR-ELISA برای تشخیص سریع توکسوپلاسموزیس راه‌اندازی شد. در این روش آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی برای هدف‌گیری ژن *RE* مربوط به تاکی‌زوئیت به‌طول ۱۳۸ جفت‌باز انتخاب شده و برای تکثیر DNA توکسوپلاسما گونده‌ای، از فرایند PCR و نشاندار کردن همزمان محصول به‌دست آمده از آن با دیگوکسی‌ژنین استفاده شد. قطعه نشاندار شده با DIG، با پروب اولیگونوکلئوتید بیوتینیله شده اختصاصی دورگه می‌شود و سپس به استرپتاودین پوشش‌دار شده در پلیت اضافه می‌شود. دورگه DNA-DNA ایجاد شده با اضافه کردن آنتی‌بادی ضد دیگوکسی‌ژنین کونژوگه شده با پراکسیداز و با روش کلریمتری قابل شناسایی است.
نتایج: با استفاده از سیستم PCR-ELISA، ژن *RE* توکسوپلاسما گونده‌ای در مدت ٤ ساعت و با حساسیت بالا مورد شناسایی قرار گرفت. در ضمن آزمایش‌هایی برای بررسی حساسیت روش به‌کار برده شده، انجام گرفت و منحنی استاندارد مربوط به حساسیت روش نیز رسم شد. DNA توکسوپلاسما پس از ٤ ساعت قابل شناسایی است و در این روش عوامل دیگر دخالت ندارند؛ بنابراین فقط این انگل تکثیر و شناسایی می‌شود.
نتیجه‌گیری: کارایی PCR-ELISA ارزیابی شد و ارزیابی‌ها نشان داد که از مزیت‌های این روش سریع، حساس، مطمئن و ساده بودن آن است؛ بنابراین می‌توان از آن به‌عنوان یک روش تشخیصی استفاده کرد.

کلیدواژگان: PCR-ELISA، توکسوپلاسموزیس، ژن *RE*، رت.

* **نشانی مکاتبه**: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی پزشکی، صندوق پستی: ۳۳۱-۱٤۱۱۵.
Email: ghafarif@modares.ac.ir

۱- مقدمه

توکسوپلاسموزیس (Toxoplasmosis) بیماری عفونی ناشی از آلودگی با تک یاخته‌ای درون سلولی به‌نام توکسوپلاسما گونده‌ای (*Toxoplasma gondii*) است [۱- ۳]. در افراد دارای ایمنی کامل، توکسوپلاسموزیس معمولاً فاقد علامت است یا به‌صورت تظاهرات پوستی (بثورات جلدی)، آدنوپاتی (Adenopathy) یا عارضه چشمی بروز می‌کند. در نوزادانی که از طریق مادرزادی آلوده می‌شوند و بیماران با نقص ایمنی مانند مبتلایان به ایدز (Acquired immunodeficiency syndrome: AIDS) و دریافت‌کنندگان عضو پیوندی، توکسوپلاسموزیس، ممکن است تهدیدکننده زندگی آن‌ها باشد [٤، ٥]. توکسوپلاسموزیس مادرزادی که حاصل عبور انگل از جفت در هنگام آلودگی اولیه مادری است، می‌تواند باعث سقط جنین خودبه‌خودی، مرگ جنین در رحم یا نقص‌های شدید مادرزادی نظیر هیدروسفالی (Hydrocephaly)، میکروسفالی (Microcephaly)، عقب‌ماندگی ذهنی و کوریورتینیت (Chorioretinitis) شود و در افراد با ایمنی سرکوب شده نظیر افراد مبتلا به AIDS، دریافت‌کنندگان پیوند و افراد مبتلا به سرطان‌هایی مثل هوچکین (Hotchkin) و... می‌تواند دوباره فعال و باعث ایجاد آنسفالیت توکسوپلاسمایی شده و یکی از علل مرگ و میر این افراد محسوب شود [٤، ٦]. با توجه به عوارض و ضایعات جبران‌ناپذیر در افرادی با ایمنی سرکوب شده و در نوزادان متولد شده، تشخیص توکسوپلاسموزیس و متعاقب آن درمان، ضروری است. اگر چه تشخیص توکسوپلاسموزیس مبتنی بر آزمون‌های سرولوژیکی است ولی این روش‌ها در مواردی کارایی لازم را ندارند. از جمله این موارد می‌توان به ظهور تأخیری پادتن‌های اختصاصی علیه توکسوپلاسما و افزایش تدریجی میزان آن‌ها اشاره کرد؛ در این شرایط و در ابتدای آلودگی، توکسوپلاسموزیس قابل تشخیص نیست. از طرفی در افراد دچار نقص یا سرکوب سیستم ایمنی پادتن‌ها به حد کافی ظاهر نمی‌شوند. علاوه بر این، قابلیت انتقال پادتن‌ها نوع IgG از مادر به جنین، تشخیص زود هنگام توکسوپلاسموزیس را در جنین با اشکال مواجه می‌کند. به‌همین دلیل روش‌های مستقیم تعیین حضور انگل در بافت‌ها و مایعات بدن، کارامدتر هستند. از بین روش‌های مستقیم روش مشاهده انگل در مقاطع بافتی حساسیت کافی را ندارند و روش تشخیص آنتی‌ژن‌ها در این نمونه‌ها، به‌دلیل مزمن بودن و کیستی شدن انگل، غیر واقعی است [٦- ٨].

روش PCR که در آن قطعه‌ای از DNA ژنومی توکسوپلاسما قابل شناسایی است به‌دلیل حساسیت و ویژگی کافی و نیز حصول سریع نتیجه از سایر روش‌های تشخیصی فعلی نتایج بهتری ارائه داده است.

با مطالعه روی ژنوم توکسوپلاسما، قطعه‌ای از DNA به‌نام *RE* در ژنوم شناسایی شد. این قطعه بین ۲۰۰-۳۰۰ نسخه در ژنوم دارد و برای انگل نیز اختصاصی است. همچنین این قطعه DNA هیچ پروتئین را کد نمی‌کند. با توجه به ویژگی‌های این قطعه از DNA، در این پروژه از قطعه *RE* برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در مدل حیوان آلوده استفاده شد. حساسیت آغازگرهای (Primers) طراحی شده براساس این قطعه DNA به اندازه‌ای است که حتی وجود یک عدد تاکی‌زوئیت (Tachyzoite) توکسوپلاسما را مشخص می‌کند [۹].

تشخیص توکسوپلاسموزیس در میزبان به‌روش PCR زمانی ارزش بیشتری می‌یابد که در مرحله اول از آغازگرهایی با حساسیت بالا استفاده شود و پس از آن نمونه بالینی مورد آزمایش به‌راحتی در دسترس باشد. با توجه به این‌که در این بیماری، مدل حیوانی رت به انسان شباهت زیادی داشته و سیر بیماری در رت مشابه سیر آن در بدن انسان است (در مغز رت مشابه مغز انسان تشکیل کیست‌های حاوی برادی‌زوئیت (Bradyzoite) وجود دارد) از رت به‌عنوان مدل آزمایشگاهی مطلوب استفاده شد. به‌دلیل حساسیت و سرعت بالا از الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) برای ردیابی محصولات PCR استفاده شد. هدف این مطالعه، راه‌اندازی سیستمی برای تشخیص سریع توکسوپلاسموزیس است که از حساسیت و ویژگی کافی برخوردار باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تکثیر و نگهداری سویه RH توکسوپلاسما گونده‌ای

به‌منظور تکثیر و نگهداری سویه RH توکسوپلاسما گونده‌ای از روش تزریق درون صفاقی موش‌های ماده (Mus musculus) با سن حدود ٦ هفتگی استفاده شد [۱]. مایع صفاقی موش، حاوی ۱۰۰۰ تاکی‌زوئیت (در هر میدان با بزرگنمایی ٤۰ میکروسکوپ نوری) به داخل صفاق موش‌ها تزریق شد. پس از ۳-٤ روز موش‌ها را با کلروفرم بیهوش و کشته و سپس مایع صفاقی آن‌ها با سرنگ خارج شد. تاکی‌زوئیت‌های تکثیر یافته با میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ٤۰) قابل مشاهده است. این مایع صفاقی به‌عنوان منبع اصلی برای نگهداری انگل یا تزریق به موش و تکثیر تاکی‌زوئیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد [٤].

۲-۲- آلوده‌سازی رت‌ها

تعداد ۱۵ سر رت ماده ۲-۳ ماهه به دو گروه ۱۰ تایی (مورد آزمایش) و ۵ تایی (شاهد) تقسیم شدند. تاکی‌زوئیت‌های استخراج شده از موش سوری توسط لام نئوبار (Neubauer lam) شمارش شدند و با افزودن محلول PBS (Phosphate Buffered Saline)، غلظت نهایی به 10^5 عدد تاکی‌زوئیت در هر میلی‌لیتر مایع تنظیم شد. به ازای هر میلی‌لیتر سوسپانسیون، مقدار ۱۰۰ واحد پنی سیلین G و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین (Streptomycin) به آن افزوده شد [۱۰]. سپس به محوطه صفاقی هر کدام از رت‌های گروه مورد تعداد 5×10^5 عدد تاکی‌زوئیت (مقدار ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون) تزریق شد. رت‌های شاهد بدون تزریق باقی ماندند.

۲-۳- خونگیری از رت‌ها

۲ تا ۱۷ روز بعد از تزریق، انگل‌ها در خون حضور دارند، بنابراین ٤۸ ساعت بعد از تزریق، خونگیری به اندازه ۱ سی‌سی از قلب تمام رت‌ها انجام گرفت و در تمام مدت تحقیق فقط یک‌بار از حیوانات خونگیری شد و بلافاصله با ماده ضد انعقاد (Ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) به نسبت ۱ به ۱۰ مخلوط و در میکرولوله ۱/۵ میلی‌لیتری در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌ها به‌منظور استخراج DNA و انجام PCR نگهداری شد.

۲-٤- نشاندار کردن محصول PCR با دیگوکسی‌ژنین (Digoxigenin)

بعد از استخراج DNA، واکنش PCR به‌نحوی انجام شد که علاوه بر تکثیر ناحیه ژنی، محصول تولیدی همزمان با مولکول هاپتن دیگوکسی‌ژنین نشاندار شود. این فرایند با واسطه قرار گرفتن نوکلئوتید تغییر یافته (Digoxigenin-11-dUTP) در بین dNTP ها انجام گرفت و واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با دمای اتصال (Annealing) ۵۸ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ انجام شد. البته در هر واکنش کنترل منفی که لوله بدون DNA انگل توکسوپلاسما است گذاشته شد.

۲-۵- آغازگرها و پروب‌ها (Probes)

آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش بر اساس قطعه‌ای از ژنوم توکسوپلاسما گونده‌ای به‌طول ۱۳۸ جفت‌باز مطابق با ترتیب ژنوم توکسوپلاسما با شماره دسترسی AF146527 در بانک ژنی طراحی و ساخته شد. این قطعه DNA هیچ پروتئینی را کد نمی‌کند و به‌دلیل ۲۰۰ تا ۳۰۰ بار تکرار در ژنوم، از حساسیت بالایی برخوردار است. از طرفی با استفاده از سیستم PCR-ELISA، ژن *RE* توکسوپلاسما گونده‌ای در مدت ٤ ساعت و با حساسیت بالا شناسایی شد. توالی آغازگرها و پروب‌ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ مشخصات آغازگرها و پروب.

نام آغازگرها و پروب	توالی نوکلئوتیدی	دمای Tm	طول محصول
DNF	5´ AAGGCGAGGGTGAGGATG 3´	٦۱	۱۳۷ جفت‌باز
DNR	5´ GCGTCGTCTCGTCTGGATC 3´	۵۸/۲	۱۳۷ جفت‌باز
DNP	پروب: بیوتین 5'- GGAGAGGGAGAA GATGTTTC -3´	–	–

طراحی پروب یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده موفقیت یا شکست دورگه‌سازی (Hybridization) اولیگونوکلئوتید است، بنابراین پروب‌های اختصاصی با انتهای ′۵ نشاندار شده با بیوتین توسط نرم‌افزار الیگو طراحی و به‌وسیله شرکت MWG آلمان ساخته شدند (شکل ۱).

```
>gi|5916167|gb|AF146527.1|AF1465
27 Toxoplasma gondii repeat region
CTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTGTTTTTTTA
TTTTTTTTTCTTTTTGTTTTTCTGATTTTTGTTT
TTTTTGACTCGGGCCCAGCTGCGTCTGTCGGGAT
GAGACCGCGGAGCCGAAGTGCGTTTTCTTTTTTT
GACTTTTTTTTTGTTTTTTCACAGGCAAGCTCGCC
TGTGCTTGGAGCCACAGAAGGGACAGAAGTCGAA
GGGGACTACAGACGCGATGCCGCTCCTCCAGCCG
TCTTGGAGGAGAGATATCAGGACTGTAGATGAAG
GCGAGGGTGAGGATGGGGGTGGCGTGGTTGGG
AAGCGACGAGAGTCGGAGAGGGAGAAGATGTTTC
CGGCTTGGCTGCTTTTCCTGGAGGGTGGAAAAAG
AGACACCGGAATGCGATCCAGACGAGACGACG
CTTTCCTCGTGGTGATGGCGGAGAGAATTGAAGA
GTGGAGAAGAGGGCGAGGGAGACAGAGTCGGAGG
CTTGGACGAAGGGAGGAG
GAGGGGTAGGAGAGGAATCCAGATGCACTGTG
TCTGCAG
```

شکل ۱ محل توالی آغازگرها و توالی پروب در قطعه *RE*.

۲-۶- آشکارسازی محصول PCR به‌وسیله ELISA

پس از اضافه کردن ۲ میکرولیتر از محصول نشاندار شده PCR با دیگوکسی‌ژنین به ۱۰ میکرولیتر محلول واسرشتگی (Denaturation solution) شامل NaOH با غلظت ٤/٤ میلی‌مولار)، به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس ۱۲/۵ میکرولیتر از محلول دورگه‌سازی (حاوی غلظت ۱۰ نانومولار از پروب اختصاصی) به آرامی با محصول PCR مخلوط و دورگه‌های به‌دست آمده در لوله‌ها به چاهک‌های اندود شده با استرپتواویدین (Streptoavidin) منتقل شد و پس از پوشاندن دهانه چاهک‌ها با برچسب مخصوص در دمای اختصاصی ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه هیبریدایزر (Hybridizer) برای مدت ۱/۵ ساعت همراه با چرخش آرام نگهداری شد.

پس از اتمام زمان انکوباسیون ستون‌های پلیت ELISA از هیبریدایزر خارج گشته و محتویات داخل آن ها بلافاصله خالی شد. چاهک‌ها ۵ مرتبه و هر بار با ۳۰۰ میکرولیتر از محلول شستشو شسته شد و روی دستمال کاغذی تمیز تکان داده شد.

به هر یک از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از کونژوگه آنزیمی آنتی دیگوکسی‌ژنین آنتی‌بادی کونژوگه به HRP (Horseradish Peroxidase) (ساخته شده) با رقت ۱:۱۰۰۰ اضافه گشت و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با چرخش آرام نگهداری شد. سپس محتویات چاهک‌ها خالی و مجدداً ۵ مرتبه با بافر شستشو شسته شد و سپس به هر یک از چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رنگ‌زای سوبسترا (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6 sulphonic acid: ABTS) اضافه و برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با چرخش آرام نگهداری شد تا رنگ ظاهر شود و چون رنگ تولید شده تا ۰/۵-۱ ساعت بعد تغییر نمی‌کند نیازی به متوقف کردن واکنش نیست. سپس جذب نوری (Optical Density: OD) هر یک از چاهک‌ها با قرائت‌گر ELISA (ELISA Reader) چندکاناله و در طول موج ٤۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و در روابط مربوط برای تفسیر نتایج قرار گرفت.

لازم به ذکر است که بافرهای مورد اشاره در این مرحله از شرکت Roche آلمان تهیه شد. در هر واکنش یک چاهک به‌عنوان NSB (Non Specific Binding) در نظر گرفته می‌شود تا درستی و نادرستی عملکرد اجزاء را تحت کنترل باشد [٦].

۲-۷- بهینه‌سازی غلظت پروب

کاهش یا افزایش غلظت پروب، دورگه‌سازی موفقی را به‌دنبال نخواهد داشت. کاهش پروب موجب کاهش اتصال به محصول PCR و در نتیجه کاهش علائم تولیدی از سیستم ELISA خواهد شد. افزایش پروب هم باعث افزایش اتصالات غیراختصاصی و در نتیجه عدم اتصال پروب به محصول PCR خواهد شد. بدین ترتیب برخی از دورگه‌ها به‌دلیل عدم اتصال، طی مراحل شستشو از محیط خارج شده و موجب کاهش علامت در مرحله نهایی می‌شوند. پس از نشاندار کردن قطعه

مورد نظر، این قطعه با پروب مخصوص در غلظت‌های ۰/۲ پیکومول، ۰/۰۲ پیکومول و ۰/۰۱ پیکومول مجاور شده و واکنش ELISA انجام شد.

۲-۸- بررسی حساسیت ELISA با رقت‌سازی محصول PCR

پس از استخراج DNA ژنومی، غلظت آن با خواندن OD در ۲٦۰ نانومتر و ضریب رقت ۱/۵۰ تعیین و غلظت طبق این فرمول محاسبه شد:

رقت × ۵۰ (میکروگرم در میلی‌لیتر) × OD۲٦۰= غلظت DNA (برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر)

از DNA اولیه با غلظت ۲۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر، حجم ۲/۵ میکرولیتر وارد واکنش PCR شد و بعد از نشاندار کردن محصولات مربوط، رقت‌سازی در log۱۰ روی محصول PCR انجام شد. رقت‌ها در پنج لوله تهیه شدند به‌طوری‌که آخرین رقت ۱/۱۰۰۰۰ شد. از هر کدام از لوله‌ها، حجم ۲/۵ میکرولیتر از محصول PCR نشاندار شده برداشته و وارد فرایند ELISA شد.

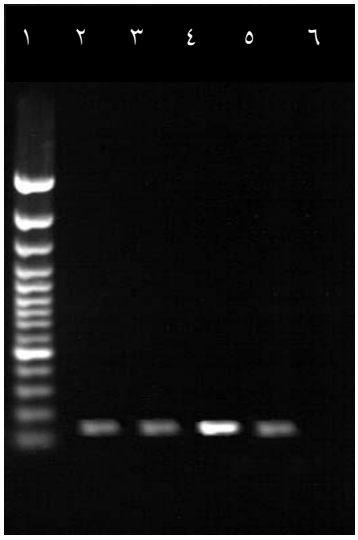
۲-۹- رسم منحنی استاندارد

برای شناسایی کمی توالی هدف به‌وسیله PCR-ELISA، باید منحنی استاندارد رسم شود. برای این کار، ابتدا رقت‌های متوالی از DNAی استخراج شده، که غلظت اولیه آن ۲۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود، تهیه و OD مربوط به هر کدام از DNAها به‌وسیله دستگاه بیوفتومتر (Biophotometer) سنجیده شد. سپس از هر کدام از رقت‌ها حجم ۲/۵ میکرولیتر وارد واکنش PCR شد و با تعداد ۲۰ چرخه همزمان تکثیر یافت. ازمحصول PCR نشاندار شده، حجم ۲/۵ میکرولیتر وارد واکنش ELISA شد. این قطعه نشاندار شده حاصل از واکنش PCR در چاهک‌های مربوط به پروب‌های مخصوص متصل شد و از ODهای به‌دست آمده در مقیاس لگاریتمی، یک منحنی رسم شد. با استفاده از مدل‌های آماری، خطی بودن واکنش مورد بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج

۳-۱- بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR

بهینه‌سازی واکنش با بررسی گرادیان دمایی انجام شد. به‌منظور بهینه‌سازی دمای واکنش محدوده دمایی بین ٥٤-٦٤ بررسی و دمای مناسب اتصال، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد و باند ۱۳۸ جفت‌باز ناشی از تکثیر مناسب الگو قابل بررسی است (شکل ۲).

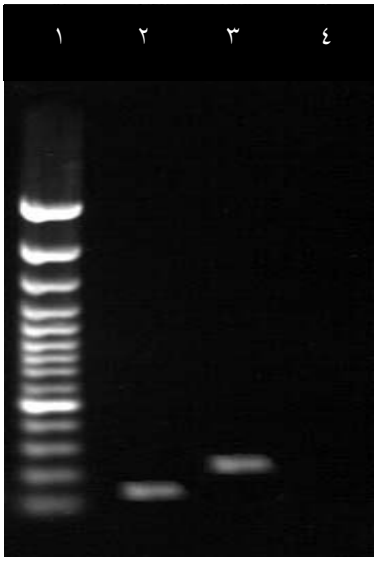


شکل ۲ نتیجه PCR با دماهای متفاوت اتصال و غلظت ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$. **چاهک ۱:** نشانگر (Marker) ۱۰۰ جفت‌باز؛ **چاهک ۲:** دمای٥٤ درجه؛ **چاهک ۳:** دمای ٥٦ درجه؛ **چاهک ٤:** دمای ۵۸ درجه؛ **چاهک ۵:** دمای ٦۲ درجه؛ **چاهک ٦:** کنترل منفی.

۳-۲- نشاندار کردن محصول PCR با دیگوکسی‌ژنین

به‌منظور شناسایی اختصاصی قطعه ۱۳۸ جفت‌باز در واکنش ELISA، این قطعه با استفاده از dNTPهای نشاندار با دیگوکسی‌ژنین، نشاندار شد و با توجه به این‌که dNTP نشاندار شده با دیگوکسی‌ژنین دارای وزن بالایی است، بنابراین تغییر مکان قرارگیری باند مربوط به قطعه نشاندار شده با

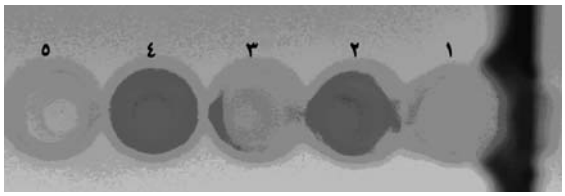
دیگوکسی‌ژنین در مقایسه با قطعه کنترل در شکل ۳ به نمایش درآمده است.



شکل۳ مقایسه قطعه نشاندار شده با دیگوکسی‌ژنین و قطعه کنترل. **چاهک ۱:** نشانگر ۱۰۰ جفت‌باز؛ **چاهک۲:** محصول PCR؛ **چاهک ۳:** محصول PCR نشاندار شده با دیگوکسی‌ژنین؛ **چاهک ٤:** کنترل منفی.

۳-۳- بهینه‌سازی غلظت پروب

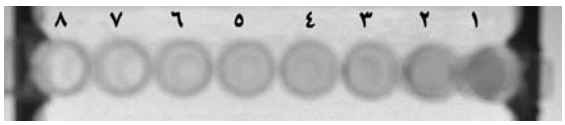
به‌منظور به‌دست آوردن غلظت مناسب پروب برای واکنش، از غلظت‌های مختلف پروب استفاده شد و رنگ سوبسترای ABTS در نتیجه اتصال اختصاصی قطعه به پروب در غلظت ۰/۰۲ پیکومول از بقیه بهتر بود. بنابراین واکنش ELISA با غلظت ۰/۰۲ پیکومول پروب انجام شد و نتیجه آن در شکل ٤ به نمایش درآمده است.



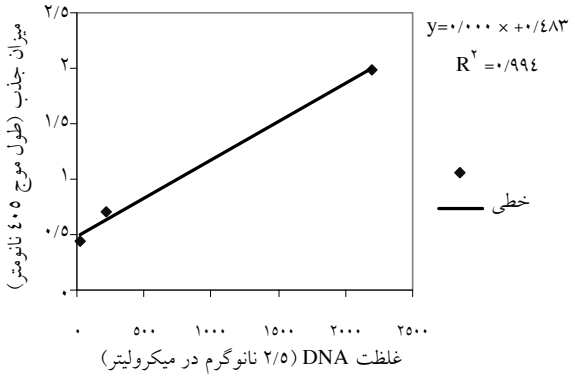
شکل ٤ پلیت میکروتیتر ELISA جهت بهینه‌سازی غلظت پروب. **چاهک ۱:** اتصال قطعه به پروب مربوطه با غلظت ۰/۰۱پیکومول؛ **چاهک ۲:** غلظت پروب ۰/۰۲ پیکومول؛ **چاهک ۳:** غلظت پروب ۰/۲ پیکومول؛ **چاهک ٤:** کنترل غلظت پروب ۰/۰۲ پیکومول (کنترل مثبت)؛ **چاهک ۵:** NSB (کنترل منفی).

۳-٤- نتایج حاصل از بررسی حساسیت ELISA با رقت‌سازی محصول PCR

از DNA اولیه با غلظت ۲۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر، حجم ۲/۵ میکرولیتر وارد واکنش PCR شد و بعد از نشاندار کردن محصولات مربوط، رقت‌سازی در log۱۰ روی محصول PCR انجام شد. رقت‌ها در پنج لوله تهیه شدند به‌طوری‌که آخرین رقت ۱/۱۰۰۰۰ شد. از هر کدام از لوله‌ها، حجم ۲/۵ میکرولیتر از محصول PCR نشاندار شده برداشته و وارد فرایند ELISA شد. نتایج حاصل از بررسی حساسیت ELISA با رقت‌سازی محصول PCR در شکل ۵ نشان داده شده است. نمودار ۱ نیز منحنی مربوط را نشان می‌دهد.



شکل ۵ پلیت میکروتیتر ELISA براساس رقت‌سازی محصول PCR. **چاهک ۱:**اتصال قطعه به پروب مربوط بدون رقیق‌سازی؛ **چاهک ۲:** غلظت ۱/۱۰ محصول PCR؛ **چاهک ۳:** غلظت ۱/۱۰۰ محصول PCR؛ **چاهک ٤:** غلظت ۱/۱۰۰۰ محصول PCR؛ **چاهک ۵:** غلظت ۱/۱۰۰۰۰ محصول PCR؛ **چاهک ٦:** NSB.

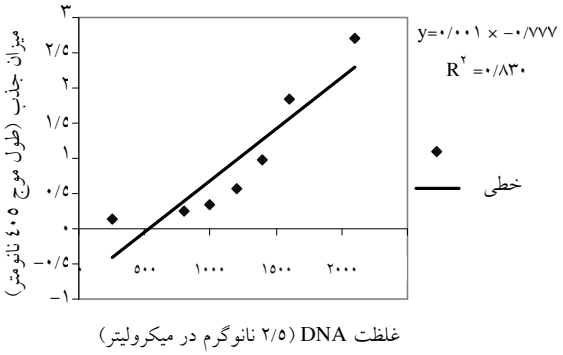


نمودار ۱ نتیجه بررسی حساسیت ELISA با رقت‌سازی محصول PCR.

۳-۵- رسم منحنی استاندارد

از DNAی استخراج شده، که غلظت اولیه آن ۲۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر بود، رقت‌سازی سریال تهیه و OD مربوط به هر کدام از DNAها به‌وسیله دستگاه بیوفتومتر سنجیده شد و سپس حجم ۲/۵ میکرولیتر از هر کدام از

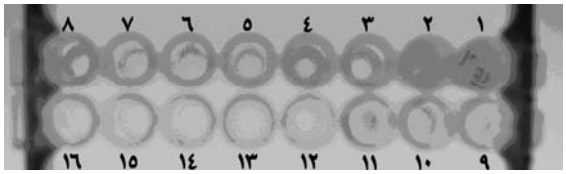
رقت‌ها وارد واکنش PCR شد. محصولات به‌دست آمده وارد واکنش ELISA شد و نتیجه در نمودار ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲ منحنی استاندارد. منحنی حاصل از تکثیر رقت‌های متوالی از DNA اولیه.

۳-٦- نتایج ELISA روی نمونه‌های خون رت‌ها

۲/۵ میکرولیتر از DNAهای استخراج شده از خون رت‌های (مورد و شاهد) موجود وارد واکنش PCR شد و بعد از به‌دست آوردن محصولات نشاندار شده، وارد فرایند ELISA شد. بعد از به‌دست آوردن ODهای مربوط، غلظت DNAها از روی منحنی استاندارد محاسبه شد و نتایج در شکل ٦ و جدول ٥ آمده است.



شکل ٦ نتایج نمونه‌های کار شده با روش PCR-ELISA. **چاهک ۱:** اتصال قطعه به پروب مربوط (کنترل مثبت)؛ **چاهک‌های ۲-۱۱:** نمونه‌های کار شده مورد؛ **چاهک‌های ۱۲-۱٦:** نمونه‌های شاهد.

٤- بحث

روش آزمایشگاهی متداول برای تشخیص توکسوپلاسموزیس از دهه‌های پیش تاکنون، روش سرولوژی بوده است، اما با شروع عفونت ویروس نقص ایمنی انسان (Human immunodeficiency virus: HIV) و افزایش پیوند اعضاء و استفاده از داروهای سرکوب‌کننده ایمنی

جدول ٥ نتایج نمونه‌های کار شده با روش PCR-ELISA..

نمونه آزمایش شده	میزان OD در طول موج ٤٠٥ نانومتر	غلظت DNA (۲/٥ نانوگرم در میکرولیتر) انگل توکسوپلاسما
کنترل مثبت	۱/٥	۱٥٦۰
خون رت شماره ۱	۰/٦۷	۱۱٤٥
خون رت شماره ۲	۰/٥٥	۱۰۸٥
خون رت شماره ۳	۰/۳٤	۹۸۲/٥
خون رت شماره ٤	۰/۳٥	۱۰۰۷/٥
خون رت شماره ٥	۰/٤۰	۱۰٤۲/٥
خون رت شماره ٦	۰/٤۷	۱۱۷۰
خون رت شماره ۷	۰/۲۰	۹۰۷/٥
خون رت شماره ۸	۰/۷۲	۱۱۱٥
خون رت شماره ۹	۰/٦۱	۱۰٦۷/٥
خون رت شماره ۱۰	۰/٥۲	۱۰۸۳
خون رت شماره ۱۱(شاهد)	۰/۱٥	۳٥۳/۷
خون رت شماره ۱۲(شاهد)	۰/۱٤	۳٥۱/۷
خون رت شماره ۱۳(شاهد)	۰/۱۲	۳٤۷/۷
خون رت شماره ۱٤(شاهد)	۰/۱٥	۳٥۳/۷
خون رت شماره ۱٥(شاهد)	۰/۱٦	۳٥٥/۷
NSB	۰/۱٤	۳٥۱/۷

نشانگرهای بالینی مختلفی از عفونت توکسوپلاسموزیس آشکار شد و بیماری خود را به‌صورت یک بیماری مرگ‌آور، بروز داد. از طرفی عوارض جبران‌ناپذیر عفونت توکسوپلاسموزیس مادرزادی محققین را بر آن داشت که از روش‌های حساس و اختصاصی غیر از روش‌های سرولوژی استفاده نمایند [۹، ۱۱].

امروزه، روش‌های تشخیص مولکولی، در جهان پیشرفت بسیاری یافته‌اند و روز به روز روش‌های جدیدتر و با کارایی

بیشتری پا به عرصهٔ تشخیص بیماری‌ها و مطالعات مولکولی می‌گذارند. در بین این روش‌ها، روش‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک، جایگاه ویژه‌ای یافته‌اند. چون این روش‌ها از حساسیت و اختصاصیت زیادی برخوردارند، بنابراین برای تشخیص میکروارگانیسم‌ها در بیماری‌ها نقش به‌سزایی داشته‌اند. روش تکثیری PCR یکی از شناخته‌شده‌ترین این روش‌های تشخیص مولکولی می‌باشد و تاکنون بر روی اغلب میکروارگانیسم‌ها، مورد بررسی قرار گرفته است. این تکنیک، به‌علت سریع و ساده بودن و همچنین حساسیت و دقت بالایی که دارد، توانسته در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، جایگزین روش‌های سنتی تشخیص بیماری‌ها شود. امروزه در اغلب کشورها به‌کارگیری PCR و دیگر روش‌های تشخیص مولکولی یکی از ضروریات و اولویت های مهم در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به‌شمار می‌آیند. با توجه به امتیازهایی که این روش‌ها، نسبت به روش‌های سنتی تشخیص بیماری‌ها دارند، توجه و استفاده از آن‌ها در داخل کشور می‌تواند بسیاری از مشکلات موجود در این زمینه را برطرف سازد و گام بزرگی در راستای ارتقای سطح کیفی تشخیص بیماری را در کشور فراهم سازد [۱۲، ۱۳].

هدف از این پروژه، راه‌اندازی و به‌کارگیری روش PCR-ELISA برای تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس است.

در تشخیص توکسوپلاسما گونه‌ای به روش PCR از ژن‌های متعددی استفاده می‌شود ولی ژن‌های *B1* و *P30* توکسوپلاسما کاربرد بیشتری دارد [۷، ۱۱، ۱۳]. در به‌کارگیری این ژن‌ها حساسیت روش را معادل ۱۰ ژنوم توکسوپلاسما در تعداد 10^5 لوکوسیت انسانی گزارش کرده‌اند [۱۰، ۱٤، ۱۵]. حساسیت ژن *B1* به وجود تعداد ۳۵ کپی از آن در ژنوم توکسوپلاسما مربوط است. هر چه تعداد کپی‌های یک ژن یا قطعه‌ای ازDNA در ژنوم بیشتر باشد حساسیت تشخیصی آن با روش PCR بیشتر خواهد بود. قطعه *RE* در ژنوم توکسوپلاسما علاوه بر اختصاصی بودن دارای تعداد کپی‌های زیادی بوده و حساس‌تر از قطعه *B1* است بنابراین برای تشخیص مناسب‌تر است [۹].

در تحقیق حاضر برای آشکارسازی محصولات PCR، از یک روش دورگه‌سازی در فاز مایع یا ELISA استفاده شد. نیاز به یک روش آشکارسازی برای محصولات تکثیر واکنش‌های مولکولی که بتواند حساسیت و اختصاصیت کافی را نیز ارائه نماید، ما را بر آن داشت که از این روش برای ردیابی ژنوم انگل استفاده کنیم. برخی از روش‌ها مانند الکتروفورز روی ژل از حساسیت و اختصاصیت بسیار پایینی برخوردار هستند. در این پروژه روش ELISA به‌دلیل ساده بودن مراحل کار که تماماً چند مرحله انتقال، افزایش و انکوباسیون را شامل می‌شود، افزایش ویژگی تکنیک با به‌کارگیری پروب اختصاصی، حساسیت بالای این روش نسبت به رنگ‌آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) که ۱۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر است، عدم نیاز به UV ایلومیناتور (UV illuminator) و اتاق تاریک، امکان آنالیز نمونه‌ها در مقیاس وسیع، قابلیت تنظیم خودکار دستگاه، امکان آلودگی کم نسبت به روش‌هایی مثل لکه‌گذاری ساترن و عدم استفاده از مواد رادیواکتیو و سرطان‌زا نظیر اتیدیوم بروماید که از ایمنی و سلامت بالایی برخوردار است، برای آشکارسازی محصولات PCR انتخاب شد.

تکنیک‌های جدیدتر مانند Real-time نیز به طرز موفقی برای ارزیابی کمی وکیفی اسیدهای نوکلئیک مورد استفاده قرار می‌گیرند اما ELISA نیاز به تجهیزات و کاوشگرهای گران قیمتی که در Real-time استفاده می‌شود را برطرف می‌سازد و در عوض از ابزارهای پایه و متداولی که در هر آزمایشگاه تشخیصی موجود است استفاده می‌نماید.

از طرف دیگر ELISA یک ابزار بسیار انعطاف‌پذیر است که آنالیز تعداد زیاد ۹٦ تا ۳۸٤ نمونه را در یک زمان میسر می سازد.

۵- تشکر و قدردانی

مطالب این مقاله مربوط به بخشی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد است و منابع مالی آن از محل بودجه پایان‌نامه‌ها و گرانت استاد راهنما جناب آقای دکتر دلیمی است. همچنین بدین‌وسیله از اعضای محترم گروه‌های انگل‌شناسی و بیوتکنولوژی که در انجام این پایان‌نامه همکاری داشتند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

٦- منابع

[1] Luinstra K, Petrich A, Macqueen W, Macherson DW, McMaster University, Hrlmp, St. Joseph'Hospital, Hamilton, ON. Comparison of Two Extraction Methods for Detection of Toxoplasma gondii in Paraffin-Embedded Tissue by PCR Testing. Mol Cell Probes 2002; 16:31-9.

[2] Assmar M, Terhovanessian A, Fajrak H, Naddaf SR. Detection of Toxoplasma gondii in deat fetuses by polymerase chain reaction (PCR). J Med Sci 2000; 25(1&2): 59-61.

[3] Remington JS, Dosmonts G, Remington JS, Klein (Eds). Infection diseases of fetus Newborn Infats. 3th edition, W.B. Saunders Company, 1990; p: 89-195.

[4] Dubey JP. Toxoplasmosis. Microbiology and Microbial infection. Vol: 5, New York, Oxford University Press, 1998; p: 303-18.

[5] Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-Time PCR for quantitative detection of Toxoplasma gondii. J Clin Microbiol 2000; 38(11): 4121-5.

[6] Gill P. Qualitative and quantitative detection of two common beta-thalassemia mutations in Iran by DNA solution hybridization. Presented for the M.Sc., Tehran, Tarbiat Modares University, 2005. (Persian)

[7] Hierl T, Reischl U, Lang P, Hebart H, Stark M, Kyme P, Autenrieth IB. Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of Toxoplasma gondii in immunocompromised patients. J Med Microbiol 2004; 53(Pt 7): 629-32.

[8] Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, Dubey JP, Lunney JK. Development of a real-Time PCR assay for detection of Toxoplasma gondii in pig and mouse tissues. J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2065-71.

[9] Amel-Jamehdar S. Application of quantitative competitive RT-PCR ELISA and real-time RT-PCR for quantification of Human Immunodeficiency virus Type-1 (HIV-1) during specific aniretrovival therapy. Presented for the Ph.D., Tehran, Tarbiat Modares University, 2008. (Persian)

[10] Sharifian-Dorcheh M. Study on life cycle of Toxoplasma gondii in the tissue of rat by PCR and RT-PCR methods. Presented for the Ph.D., Tehran, Tarbiat Modares University, 2004. (Persian)

[11] Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital Toxoplasma infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. J Clin Microbiol 1990; 28(10): 2297–301.

[12] Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of T. Gondii in aqueous humor. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41(3): 634-44.

[13] Cassaing S, Bessières MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 720-4.

[14] Joiner KA, Dubremetz JF. Toxoplasma gondii: a protozoan for the nineties. Infect Immun 1993; 61(4): 1169-72.

[15] Markell EK, Voge M. Medical prasitology. 8th edition, W.B. Saunders. 1992; p: 160-70.