

مطالعه سه روش خالص سازی HBV DNA جهت استفاده در تکنیک PCR

دکتر نسرين شيخ*، دکتر مسعود حاجيا**، اشرف محمدخاني***، مسعود کورکی****

چکیده:

تشخیص هپاتیت B با توجه به فراوانی میزان عفونت ناشی از آن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در بین روشهای تشخیصی، اخیراً تکنیک PCR بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. گزارش های ارائه شده در مراکز که از این تکنیک استفاده مینمایند حاکی از وجود برخی از موارد منفی کاذب میباشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی مقایسه ای بین روشهای خالص سازی رایج میباشد تا ضمن آگاهی از میزان کارایی هر یک بهترین روش شناسایی گردد.

از ۳۰ نمونه دریافتی از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه هپاتیت بیمارستان شریعتی تهران که مبتلا به هپاتیت مزمن بوده و HBs آنتی ژن مثبت و HBe آنتی ژن منفی بودند نمونه سرم تهیه گردید. استخراج DNA HBV با سه روش توسعه یافته جوشاندن بعنوان یک روش سریع، روش فنل کلروفرم بعنوان یک روش دقیق، و روش خالص سازی مبتنی بر گوانیدیوم هیدروکلراید انجام گردید. کیت PCR برای تشخیص هپاتیت از شرکت سیناژن استفاده گردید که شامل آنزیم taq پلیمرز و مخلوط واکنشی متشکل از پرایمر dNTP و بافر واکنش بود. پروتکل PCR مزبور قادر به تکثیر محصولی به طول ۳۵۳ bp بود. سپس با چرخه گرمایی مناسب نمونه ها با واکنش PCR تکثیر گردید و محصول PCR در سه روش مقایسه شد.

نتایج بدست آمده در مرحله اول موید موفقیت پروتکل استفاده شده در تشخیص DNA هپاتیت B در سرم بود. همچنین میزان موارد مثبت روش جوشاندن، روش فنل کلروفرم و کیت خالص سازی به ترتیب ۱۹، ۱۶ و ۲۳ و موارد منفی به ترتیب ۱۴، ۱۱ و ۷ مورد بود.

روش PCR سریعترین و دقیق ترین روش جهت شناسایی بیماران بوده و روش تخلیص DNA توسط گوانیدیوم هیدروکلراید در ویروس ها موفقیت آمیز ترین روش بکار رفته در این بررسی است.

کلید واژه ها: اسید نوکلئیک / واکنش زنجیره پلیمرز / هپاتیت B

مقدمه:

به ۴۰۰ میلیون نفر رسید. در ایران آلودگی به ویروس هپاتیت B شایعترین علت بیماریهای کبدی بوده و میزان آلودگی بین ۲/۵ تا ۳/۴ درصد گزارش شده است (۱). شاخص سرولوژیک دیگر عفونت HBV که به آسانی قابل

هپاتیت B نهمین بیماری شایع عفونی در دنیا میباشد. بر طبق گزارش WHO پنج درصد تمام مردم دنیا دارای آنتی ژن HBs هستند که این تعداد در سال ۲۰۰۰

* استادیار گروه بیوشیمی و تغذیه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

** دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

*** کارشناس ارشد بیوشیمی

**** کارشناس مسئول اطلاع رسانی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

تست خواهد داشت. در صورتیکه خالص نمودن DNA در نمونه بالینی از کیفیت پایینی برخوردار باشد، بواسطه اثر مهارکنندگی مواد موجود در نمونه و یا استفاده شده در مراحل خالص سازی بر فعالیت پلیمرز نتیجه تست منفی کاذب خواهد گردید.

با توجه به مناسب بودن کیت PCR مورد استفاده در این مطالعه در تشخیص هیپاتیت B معهذاً باید توجه داشت علاوه بر مناسب بودن پرایمرها عوامل متعدد دیگری نیز می توانند در میزان حساسیت کیت تأثیر گذار باشند. یکی از مهمترین این عوامل اینست که قابلیت بازیافت DNA در روش های متفاوت خالص سازی یکسان نمی باشد. منفی شدن برخی از نمونه ها در روش جوشاندن حکایت از این دارد که این روش از حساسیت کافی برای بازیافت تمامی DNA هدف موجود در نمونه برخوردار نمی باشد و می بایست از روشهای حساس تر دیگری استفاده نمود که به آن اشاره شده است.

با توجه به آنکه برای ارزیابی طرق متفاوت خالص سازی DNA باید با نمونه های کلینیکی اقدام نمود ضروریست در بررسی حاضر روشهای خالص سازی بکار گرفته شده (فنل، کلروفورم، جوشاندن و استخراج با درجه خلوص بالا) با استفاده از ترکیب گوانیدیم هیدروکلراید) با نمونه های کلینیکی HBV مثبت مورد آزمایش و مقایسه قرار گیرد.

روش کار:

نمونه های کلینیکی: تعداد ۳۰ نمونه سرم از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه هیپاتیت بیمارستان دکتر شریعتی تهران که مبتلا به هیپاتیت مزمن بوده از نظر آنتی ژن HBs مثبت و آنتی ژن HBe منفی بودند تهیه گردید. به منظور استخراج DNA HBV با سه روش مورد نظر هر نمونه پس از تهیه به سه قسمت مساوی تقسیم گردید. نمونه برداری از بیماران و تخلیص DNA در آزمایشگاه مرکز تحقیقات گوارش بیمارستان شریعتی انجام گرفت و سایر مراحل مورد نیاز شامل آماده سازی مخلوط واکنش و امپلیفیکاسیون و الکتروفورز در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده پزشکی همدان انجام شد.

الف) استخراج DNA ویروس با روش جوشاندن: به منظور کاستن اثرات منفی حرارت جوش بر DNA به نحو زیر عمل گردید. ابتدا مقدار ۱۰۰ μl از هر نمونه سرم در میکروتیوپ به مدت ۵ دقیقه در ماکرو ویو تحت حرارت قرار گرفت. سپس به هر میکروتیوپ ۱۰ μl آب ۲ بار تقطیر

شناسایی است HB_eAg می باشد که همزمان با HB_sAg یا کمی بعد از آن ظاهر می شود. پیدایش آن بطور موقت همزمان با درجات بالای همانندسازی ویروس است و بیانگر وجود ویرونیهای دست نخورده و یا DNA HBV در گردش خون است. در عفونت های HBV که خودبخود بهبود می یابند HB_eAg اندکی بعد از به اوج رسیدن آمینوترانسفرازها و قبل از ناپدید شدن HB_sAg غیر قابل شناسایی می شود و پیش از افزایش Anti HB_e همزمان با دوره ای از کاهش نسبی عفونت زایی قابل اندازه گیری می شود (۴-۲). بررسیهای سرولوژیک پروتئینهای ویروسی نمی تواند یک شاخص قابل اعتماد برای مقدار HBV DNA باشد به دلیل اینکه ممکنست ذرات ویروسی کمی وجود داشته باشد و یا اصلاً نباشد یا ممکنست مقدار زیادی از ذرات تحت ویروسی که فاقد DNA ویروسی هستند در سرم بیمار وجود داشته باشد (۵، ۱).

روش PCR اخیراً در تشخیص و پیگیری بیماریهای عفونی از اهمیت ویژه ای برخوردار گردیده است. روش حساس تعیین مقدار DNA ویروس به وسیله PCR می تواند معرف میزان تکثیر ویروس، میزان عفونت زایی و تغییرات مقدار DNA ویروس در طی زمان عفونت یا در طی مطالعه سیکل زندگی ویروس باشد (۶).

سرعت یکی از عواملی است که نقش تعیین کننده دارد لذا باید زمان لازم برای تشخیص در مراحل سه گانه آماده نمودن نمونه، تکثیر (Amplification) و تعیین محصول مورد توجه قرار گفته و حتی المقدور کاهش یابد، به گونه ای که از زمان دریافت نمونه تا اعلام نتیجه با مدت لازم برای انجام اکثر تستهای سرولوژیکی قابل مقایسه باشد. کاهش زمان تکثیر با طرح Rapid PCR با بکارگیری از لوله های موئین و ترموسیکلر خاص (۷) و همچنین با استفاده از ترموسیکلرهای معمولی پیشنهاد شده است. ضروری است، شیوه هایی که جهت خالص سازی DNA مورد استفاده قرار می گیرد علاوه بر برخورداری از حداقل زمان و سرعت بالا، روش مطمئنی جهت حذف ممانعت کننده ها (Inhibitors) و خالص نمودن کلیه اسیدهای نوکلئیک نیز باشد. این ممانعت کننده ها گوناگون بوده و می توانند در ارتباط با نوع نمونه بالینی متفاوت باشند (۸).

در نمونه هایی که حاوی مقادیر اندکی از اورگانسیم باشند، روش خالص سازی تأثیر بسزایی در حساسیت

سانتریفوژ نمودیم. لوله‌های جمع کننده را دور ریخته و لوله‌های فیلتردار که اسیدهای نوکلئیک به فیبرهای شیشه‌ای آن متصل شده بود را به لوله‌های جمع کننده جدید منتقل نموده و به هر کدام $500 \mu\text{l}$ بافر خارج کننده ترکیبات مهار کننده (Inhibitor Removal Buffer) اضافه نموده و به مدت ۱ دقیقه در 8000g سانتریفوژ نمودیم. ته نشین را دوبار توسط $450 \mu\text{l}$ بافر شستشو نمودیم و به منظور اطمینان از خروج تمام بافر از فیلتر در 13000g برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کردیم، لوله‌های جمع کننده را دور ریخته و لوله‌های فیلتردار را به میکروتیوپ‌های $1/5 \text{ml}$ تمیز و عاری از نوکلئاز منتقل نموده و به هر کدام $50 \mu\text{l}$ بافر Elution به لوله‌های فیلتردار اضافه نموده و برای یک دقیقه در 8000g سانتریفوژ نموده اسیدهای نوکلئیک به میکروتیوپ منتقل کرده و در حجم $60 \mu\text{l}$ شناور نمودیم که در دمای 28°C قابل نگهداری بود (۱۲). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز HBV: برای انجام واکنش PCR کیت تشخیص PCR ویروس هپاتیت B شرکت سیناژن استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در این کیت جهت تشخیص DNA ویروس هپاتیت B بوسیله روش PCR در سرم و پلاسمای خون انسان و دیگر نمونه‌های انسانی طراحی گردیده است که قادر به تولید محصولی به طول 353 bp میباشد. این کیت می‌تواند جهت تشخیص HBV DNA در نمونه‌های کلینیکی و ارزیابی بازده درمان به کار رود. محتویات کیت در جدول زیر ذکر گردیده است.

مواد تشکیل دهنده کیت PCR برای تشخیص هپاتیت

مقادیر	مواد تشکیل دهنده
1 cc	1 x PCR MIX (شامل پرایمرها)
2.5 μl	Tag DNA Polymerase
(SU/UL)	
1 ml	Mineral Oil
50 μl	Positive Control
0.5ml	DNX™ (مخلوط پروتئیناز K و SDS)

پس از آماده نمودن لوله‌های آزمایش و اضافه نمودن نمونه جهت انجام PCR با استفاده از یک ترموسیکلر مدل اپندورف آلمان بر طبق برنامه جدول ارائه شده عمل شد و در انتها پس از تکثیر، نمونه‌ها در آگارز ۲٪ حاوی 0.5 mg/ml اتیدیموم بروماید الکتروفورز شدند و در مجاورت ladder 100 br توسط ترانس ایلومیناتور بررسی گردیدند (۹، ۱۱).

استریل اضافه گردید و میکروتیوپ‌ها را کاملاً ورتکس نموده و در دمای 69°C به مدت ۵ دقیقه قرار دادیم. پس از آن میکروتیوپ‌ها را مجدداً ورتکس نموده و به مدت ۱ دقیقه در 7500g سانتریفوژ نمودیم تا در حجم $30 \mu\text{l}$ بافر شناور شد (۹).

ب) استخراج DNA ویروس با روش فنل - کلروفرم: برای استخراج DNA در این روش از محلول DXP™ سیناژن که حاوی پروتئیناز K و سدیم دودسیل سولفات می‌باشد به نحو زیر استفاده شد. در یک میکروتیوپ $100 \mu\text{l}$ سرم را به $8 \mu\text{l}$ محلول DXP™ اضافه نموده کاملاً آن را ورتکس کرده و ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 60°C قرار دادیم سپس در دمای 4°C برای مدت ۵ دقیقه سرد نمودیم. در مرحله بعد به هر میکروتیوپ $100 \mu\text{l}$ فنل/کلروفرم اضافه و ورتکس نموده و به مدت ۲۰ دقیقه در 12000g سانتریفوژ کردیم. فاز آبی را به یک میکروتیوپ جدید منتقل نموده و هم حجم آن کلروفرم/ایزومیل الکل (۱:۲۴) اضافه کرده، پس از ورتکس و به مدت ۵ دقیقه در 12000g سانتریفوژ کردیم. مجدداً فاز بالایی را به یک میکروتیوپ جدید منتقل نموده و $1/10$ حجم آن سدیم استات ۳ مولار (موجود بر روی یخ) و سه حجم اتانل ۹۶٪ اضافه نموده، مخلوط مذکور برای مدت ۳۰ دقیقه به روی یخ نگهداری نمودیم. پس از سانتریفوژ به مدت ۱۵ دقیقه در 12000g به ته نشین کردیم. میکروتیوپ را به مدت ۵ دقیقه در 12000g سانتریفوژ، سپس دکانته نموده و ته نشین را تحت خلاء به مدت ۳۰ دقیقه قرار دادیم یا ۵ دقیقه در دمای 65°C خشک نمودیم. مقدار $30 \mu\text{l}$ آب دوبار تقطیر اتوکلاو شده به نمونه اضافه نموده و در دمای 20°C نگهداری کردیم (۱۰، ۱۱).

ج) استخراج DNA ویروس با استفاده از High Pure Nucleic Acid Kit: بافرهای کیت تهیه شده از شرکت سیناژن حاوی گوانیدیموم هیدروکلراید می‌باشد. در ابتدا به $200 \mu\text{l}$ سرم، $200 \mu\text{l}$ محلول کار که حاوی بافر بایندینگ می‌باشد و $50 \mu\text{l}$ پروتئیناز K اضافه نموده به سرعت مخلوط کرده و برای ۱۰ دقیقه در دمای 72°C قرار دادیم. در مرحله بعد لوله‌های فیلتردار موجود در کیت را در لوله‌های جمع کننده که آنها نیز در کیت موجود می‌باشد قرار دادیم و نمونه‌های سرم را در داخل لوله بالایی (فیلتردار) اضافه نموده و برای ۱ دقیقه در 8000g

ترتیب ۱۶، ۱۹ و ۲۳ و موارد منفی نیز به ترتیب ۱۴، ۱۱ و ۷ مورد بود (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج سه روش استخراج HBV DNA بر روی ۳۰ نمونه سرم براساس آزمون کوکران (Cochran)

روش‌های استخراج	مثبت	منفی	جمع کل	Asymp (Sig)
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	
PCR ₃ *	۲۳ (۷۶/۷)	۷ (۲۳/۳)	۳۰ (۱۰۰)	P-value = ۰/۰۰۴ Significant
PCR ₂ **	۱۹ (۶۳/۳)	۱۱ (۳۶/۷)	۳۰ (۱۰۰)	
PCR ₁ ***	۱۶ (۵۳/۳)	۱۴ (۴۶/۷)	۳۰ (۱۰۰)	

PCR₃* نتایج حاصل از روش گوانیدیوم هیدروکلراید
 PCR₂** نتایج حاصل از روش فنل - کلروفرم
 PCR₁*** نتایج حاصل از روش جوشاندن

بحث:

نتایج حاصل از آزمایش PCR با سه روش خالص سازی مشخص نمود که روش خالص سازی مبتنی بر استفاده از گوانیدیوم هیدروکلراید در نمونه های بررسی شده موفقتر از دو روش دیگر بود روش جوشاندن دارای معایب و محاسن متعددی است. این روش اصولاً دارای مرحله ای تحت عنوان خالص سازی نمیباشد، بلکه توانایی آن تنها از این نظر مهم میباشد که میتواند DNA را در دسترس قرار دهد. علاوه بر این مواد مصرفی در این روش کمتر بوده و در زمان کوتاه امکان کار با نمونه های انبوه وجود داشته و آلودگی در آزمایشگاه نیز کمتر خواهد بود. از معایب این روش هم عدم حذف کامل مهار کننده ها می باشد و دیگر اینکه روش جوشاندن قادر به استفاده نمونه های با مقادیر کم HBV DNA نمی باشد. با وجود معایب متعدد آن بواسطه سرعت مطلوب این روش، در بسیاری از آزمایشگاه ها تشخیص طبی که از PCR استفاده میگردد برای آماده نمودن DNA از آن استفاده می نمایند.

در روش فنل کلروفرم که عموماً بعنوان یک روش تحقیقاتی شناخته میگردد، میزان DNA بدست آمده نسبت به روش جوشاندن بیشتر خواهد بود و در مقایسه با آن از قدرت تخلیص بالاتری برخوردار میباشد. از معایب این روش اینست که روش فنل کلروفرم تقریباً

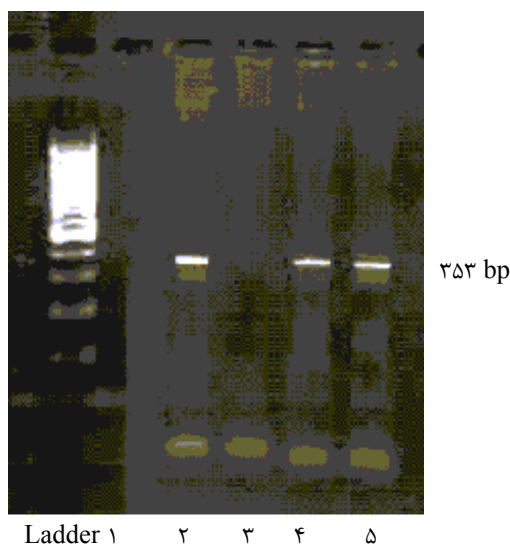
برنامه آمپلیفیکاسیون برای تکثیر در ۳۶ سیکل

مرحله	درجه حرارت (سانتیگراد)	زمان (ثانیه)
جداسازی	۹۳	۲۰ (در سیکل اول ۶۰ ثانیه)
اتصال	۶۱	۲۰
پلیمریزه نمودن	۷۲	۴۰

مخلوط واکنش در حجم ۲۵µl برای سه روش بصورت زیر آماده گردید
 ۱۵µl PCR Mix ، ۱µl DNA خالص شده ، ۹µl DDW و ۰/۴µl Tag پلیمرز

نتایج:

آزمایش کارایی سیستم: کیت تهیه شده ابتدا با کنترل مثبت مورد آزمایش قرار گرفت و نتیجه انجام PCR موید تکثیر محول مورد نظر مطابق با ۳۵۳ bp را داشت (تصویر ۱).



تصویر ۱: با استفاده از 100bp Ladder* و بررسی نمونه ها همانگونه که در شکل مشخص است نمونه های ۲ و ۴ و ۵ دارای باند ۳۵۳ bp می باشد.

* شرکت Fermentas

نتایج حاصل از آزمایش نمونه ها با روشهای سه گانه خالص سازی: نمونه های سرم جمع آوری شده مطابق روش اتخاذ شده با هر روش برای خالص سازی DNA مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ارزیابی کارایی هر روش DNA خالص شده با پرایمر های موجود در کیت تشخیصی PCR مورد آزمایش قرار گرفت. تعداد موارد مثبت در روش جوشاندن، فنل - کلروفرم و گوانیدیوم هیدروکلراید به

- chronic hepatitis B. In: Zacherman AJ, (ed). *Viral Hepatitis*. New York : Churchill-Livingstone , 1998 : 201-215.
4. Dienstag JL, Isselbacher KJ. Acute viral hepatitis In: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, (ed). *Harrison's principles of Internal Medicine*. 14th ed. New York: Mc Graw Hill, 1998.
5. Sherlock S. Clinical features of hepatitis. in: Zacherman AJ, (ed). *Viral Hepatitis*. New York: Churchill-Livingstone , 1998.
6. Kramvis A, Bukofzer S, Kew MC. Comparison of hepatitis B virus DNA extractions from serum by the QIA amp blood kit, Gene Releaser, and the phenol-chloroform method. *J Clin Microbiol* 1996; 34(11): 2731-3
7. Wittwer CT , Reed GB , Ririe KM. Rapid cycle DNA amplification . Mullis KB , Ferr F , Gibbs RA , (eds). *The polymerase chain reaction* . Boston : Brikhauser , 1994 : 174-180.
8. Higuchi R. Rapid efficient extraction for PCR from cells or blood. *PCR methods and applications* , 1989 ; 1 : 46-50.
9. Sambrook J., Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning Vol. 1*. 1-3, New York: Cold Spring Harbor Laboratory , 1989.
10. Reischl V. *Methods in molecular medicine. Molecular biology based methods in clinical diagnosis*. Totowa NJ : Humana , 1997.

۱۱. شاه‌حسینی محمدحسن. واکنش زنجیره پلیمرز.

تهران : پارسیوان، ۱۳۸۰.

12. Sommer G, Will H. Genotype specific analysis of hepatitis B virus DNA on the lightcycler. In : Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds). *Rapid cycle real-time PCR*. Philadelphia: Springer , 2000 : 303-311.

۱۳. حاجیا مسعود. ارزیابی روش یک مرحله ای خالص

سازی DNA، نمونه های بالینی. مجله پزشکی ارومیه،

سال دهم، شماره ۲، ۱۳۷۸ : ۱۰۱-۹۳.

14. Cases I. New method for the extraction of viral RNA and DNA. *J Virol Methods* 1995 ; 53: 25-36.

۱۵. حاجیا مسعود. ارزیابی پارامترهای موثر بر PCR

مایکوپلاسما. یازدهمین همایش بین المللی کنگره

پزشکی جغرافیایی. شیراز، ۱۳۷۷ : ۲۵۱

پیچیده و وقت گیر بوده و علاوه بر اینکه به وسایل یکبار مصرف بیشتری نیاز است امکان آلودگی در ضمن کار در این روش نیز بیشتر میباشد. همچنین مقدار کم فنل باقی مانده در محلول خالص شده میتواند اثر مهار کننده داشته باشد (۱۱،۱۳). جداسازی اسیدهای نوکلئیک ویروس توسط کیت خالص سازی مورد استفاده که مبتنی بر استفاده از گوانیدینوم هیدروکلراید بود در مقایسه با روش فنل-کلروفرم از سرعت برتر با لاتری برخوردار میباشد. در این روش با استفاده از مواد نظیر پروتئیناز K و گوانیدینوم هیدروکلراید DNA جدا شده، سپس توسط بافر اختصاصی مهارکننده ها نیز خارج میگردند. در مجموع در این روش بواسطه آنکه وسایل کمتری استفاده میشود، احتمال آلودگی نیز کاهش می یابد. نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر مشخص نمود که در عمل علاوه بر سرعت مطلوب این روش در میزان بازیافت DNA ویروس هم از دو روش دیگر موفق تر بوده است. استفاده از بافر های حاوی گوانیدینوم نیز قبلا مکرر بصورت موفقیت آمیز در ویروس ها گزارش شده است (۱۴). حتی در ارتباط با باکتری ها نیز گزارش شده که بافر لیز کننده حاوی تیوسیانات رضایت بخش بوده است (۱۳،۱۵).

نتایج بررسی حاضر نشان داد که روش گوانیدینوم هیدروکلراید در نمونه های مورد استفاده حساس ترین روش خالص سازی می باشد ضمناً بواسطه جایابی کمتر محلول ها در پیروسه خالص سازی احتمال آلودگی نیز کمتر خواهد بود.

سپاسگزاری :

بدینوسیله از زحمات استادان ارجمند جناب آقای دکتر ملک زاده و مهندس مانی کاشانی و همچنین از پرسنل آزمایشگاه تحصیلات تکمیلی و درمانگاه هیپاتیت بیمارستان دکتر شریعتی تهران که در انجام این تحقیق ما را یاری نموده اند تشکر میگردد.

منابع :

1. Ismail S. *Infectious disease in Iran, Viral disease section*. 3rd ed. Tehran: Alborz, 1993.
2. Chan HL, Ghany MG, Lok A. *Hepatitis B*. In : Schiff ER (ed). *Disease of the Liver*. New York : Lippincott Raven , 1999 : 757-791.
3. Decker RH. *Diagnosis of acute and*