مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره اول، شماره چهارم، پاییز ۱۳۹۰
Archive of SID

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تشخیص موتاسیون مقاوم به دارو ناحیه YMDD ژن پلی مراز ویروس HBV دربیماران مبتلا به هپاتیت B از طریق روش Ligase Chain Reaction (LCR)

لیلا خجاره*[1]، مجید صادقی زاده[2] ،گلناز بهرامعلی[3]، سامان حسینخانی[4]، مهرداد بهمنش[5]

[1]کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی- ژنتیک، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران
[2]استاد، گروه ژنتیک، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران
[3]کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی- ژنتیک، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران
[4]استادیار، گروه بیوشیمی مولکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران
[5]استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران

چکیده

سابقه و هدف: هپاتیت B، بیماری بسیار خطرناکی است که به صورت اندمیک در بسیاری از مناطق جهان مشاهده می شود. ویروس هپاتیت B (HBV) نسبت به یک سری داروهای ضد ویروسی از جمله لامیوودین حساس بوده (۹۸٪)، بطوری که به نواحی خاصی از آنزیم DNA پلی مراز ویروس متصل می گردد و مانع عمل ترانس کریپتاز معکوس و همانند سازی DNA ویروسی می شود. در اثر مصرف طولانی مدت دارو، جهشی در موتیف YMDD در دومین C ژن پلیمراز ویروس ایجاد می شود که سبب مقاومت ویروس نسبت به این دارو می گردد. در این مطالعه به منظور شناسایی سریع تر و دقیق تر موتاسیون YMDD و بنابر اهمیت شیوع موتاسیون فوق، جهت مقاومت ویروس نسبت به دارو، از طرفی ارتباط بین این تغییر ژنومی با پیشرفت بیماری های کبدی و اثر آن بر روی سیر بیماری زایی و پاسخ به درمان، روش LCR مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه، ۶۲ نمونه حاصل از Nested PCR ژن پلی مراز ویروس HBV از طریق تکنیک LCR مورد بررسی قرار گرفت. سه جفت الیگونوکلئوتید bp ۲۶-۲۱ برای ناحیه YMDD هم برای نمونه نرمال و هم برای نمونه موتان طراحی گردیدکه سبب تکثیر ناحیه bp ۴۷ شد.

یافته ها: از ۶۲ نمونه مورد بررسی، ۵۱ نفر (۸۲/۲۵٪)، بدون موتاسیون در ناحیه YMDD و ۱۱ بیمار (۱۷/۷۴٪) دارای موتاسیون در ناحیه فوق بودند.

نتیجه گیری : بررسی نتایج حاصل از LCR نشان دادکه در بیماران هم نوع وحشی و هم نوع موتان HBV وجود دارد در نتیجه برای بررسی وجود یا عدم وجود موتاسیون از الیگونوکلئوتیدهای موتان استفاده شد. نتایج حاصل از روش LCR مطابقت کامل با نتایج حاصل از تعیین توالی نشان داد.

واژه کلیدی: هپاتیت B، ژن پلی مراز ویروس هپاتیت B، موتاسیون YMDD، روش LCR

مقدمه

ویروس هپاتیت B[1] (HBV) یکی از مهم ترین و خطرناک ترین عوامل بروز هپاتیت B در انسان است. در این بیماری کبد دچار نکروز، آماس و تغییرات پاتولوژیک می گردد (Kew et al., 1998). افراد آلوده به این ویروس به انواع حاد، عفونت بدون بروز علائم و مزمن طبقه بندی می شوند. در افراد مبتلا به نوع مزمن، احتمال پیشرفت بیماری های کبدی از جمله سیروز[2]

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی- ژنتیک، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تربیت مدرس
Email: l_khojareh@yahoo.com
www.SID.ir
تاریخ دریافت مقاله: ۱۶/ ۰۶/ ۱۳۹۰
تاریخ پذیرش: ۲۸/ ۰۷/ ۱۳۹۰

1-Hepatitis B Virus
2-Cirrhosis

Archive of SID

و سرطان اولیه سلول های کبدی[1] افزایش می یابد (Collier et al., 1998). از جمله درمان های ضد ویروسی شایع در این بیماری داروی لامیوودین[2] است. اما از مشکلاتی که در جهت رسیدن به این مهم وجود دارد، ایجاد مقاومت ویروس به دارو در مصرف طولانی مدت دارو است (Zhang et al., 2003; Stanley et al., 1998). لامیوودین (۲ و ۳ دی داکسی سیاتیدین) یک آنالوگ نوکلئوزیدی است که بصورت خوراکی (۱۰۰ mg/day) در بزرگسالان تجویز می شود. این دارو مانع عمل ترانس کریپتاز معکوس شده و در نهایت از همانند سازی DNA ویروس جلوگیری به عمل می آورد که برای افراد دارای هپاتیت مزمن توصیه می شود. این دارو در بیشتر بیماران موثر بوده (۹۸ درصد) و باعث کاهش DNA ویروس و پایین آمدن آنزیم کبدی (ALT)[3] می گردد. یکی از مشکلات داروی نامبرده، ایجاد مقاومت بالای ویروس به دلیل موتاسیون در ژن های پلی مراز، Core و Precore ویروس با زمان مصرف آن (۲۳ درصد در یک سال، ۳۸ درصد در دو سال، ۵۰ درصد در سه سال و ۶۷ درصد در چهار سال) می باشد (Monjardino et al., 1998 ; Bosch et al.,1988). با توجه به مطالعات مختلف انجام شده، درمان ضد ویروسی مهم ترین عامل مشاهده شده در ایجاد موتاسیون های مهم در ناحیه ژن آنزیم رونویسی معکوس/ پلی مراز ویروس (مهم ترین هدف برای داروهای ضد ویروسی) است (Chun-Tao Wai et al., 2006). طبق گزارشات و تحقیقات گذشته مشخص شده است که موتیف YMDD (ناحیه کاتالیتیک دومن C پلی مراز که شامل تیروزین، متیونین، آسپارتات و آسپارتات می باشد) در همه هپادنا ویروس ها حفاظت شده است. ناحیه YMDD، اصلی ترین ناحیه در ایجاد مقاومت ویروس بر علیه داروهای ضد ویروسی خصوصا لامیوودین است که تمایل اتصال دارو به سویه های موتاسیون یافته را کاهش می دهد (Zhang et al., 2003; Valenzuela et al., 1979). پس از یک سال لامیوودین تراپی میزان موتاسیون در موتیف YMDD ژن پلی مراز به میزان ٪۳۲-۱۴ افزایش می یابد (Stanley et al., 1998). موتیف YMDD در اثر تعویض اسید آمینه متیونین به والین/ ایزولوسین/ سرین (۲۴۰M V/I/S) به موتیف YIDD و YVDD تبدیل می شود (جدول ۱) و در اثر این تغییرات ساختمانی مانع باند شدن دارو به این ناحیه می گردد (Balakrishna et al., 2005). با توجه به مشکلات ناشی از ویروس هپاتیت B در بروز بیماری های عفونی کبدی و اختلالات حاصل از این ویروس در بروز انواع هپاتیت B و بیماری های سیروز کبدی و هپاتوسلولار کارسینوما و با توجه به ظهور موتاسیون در موتیف YMDD با مصرف طولانی مدت دارو که معمولا با تشدید بیماری های کبدی همراه است (Hosseini et al., 2006; Sattler et al., 1979).

جدول ۱- مقایسه توالی ناحیه YMDD ژن پلی مراز با انواع جهش یافته های آن

	توالی نوکلئوتیدی											
YMDD	T	A	T	A	T	G	G	A	T	G	A	T
YIDD	T	A	T	A	T	T	G	A	T	G	A	T
YVDD	T	A	T	G	T	G	G	A	T	G	A	T

www.SID.ir

1-Hepatocellularcarcinoma
2-Lamivudine
3-Alanine aminotransferase

مطالعات جدید حاکی از موتاسیون در این ناحیه با تغییر وضعیت بالینی بیماران است، بطوری که در افراد مبتلا به سرطان کبد (HCC)، درصد شیوع این موتاسیون بالاتر از گروه های دیگر است و می توان آن را با مدت زمان مصرف بیشتر دارو مرتبط دانست (Sattler et al., 1979; Fields et al., 2001). پس باید آگاهی لازم به بیماران مصرف کننده دارو داده شود که هر ۲-۳ ماه یک بار برای تشخیص موتاسیون به کلینیک مراجعه نمایند و مورد آزمایش قرار گیرند. امروزه از روش های مختلفی همچون توالی یابی مستقیم[1] بر روی محصول PCR (Saiki et al., 1988), [2] RFLP (Chun-tao et al., 2006, Guatrlli et al., 1990), [3]LiPA (Wu et al., 1989; Barrniger et al., 1990) برای تشخیص موتاسیون های فوق به کار برده می شود. روش نوین دیگری به نام **(LCR)** Ligase chain reaction شناخته شده است که برای شناسایی موتاسیون های تک نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار می گیرد. LCR برخلاف PCR که از سه مرحله واسرشته شدن (Denaturation)، اتصال (Annealing) و طویل شدن (Extension) تشکیل شده است (Saiki et al.,1988; Conner et al., 1983)، شامل دو مرحله Denaturation و Annealing می باشد، یعنی در یک مرحله، دو رشته DNA در دمای بالای ۹۴°C از هم باز می گردد و در مرحله بعد یعنی Annealing الیگونوکلئوتیدهای طراحی شده به رشته الگو متصل می گردند. با در نظر گرفتن زمان خاص مثلا ۴ دقیقه فرصتی فراهم می گردد که اگر دو الیگونوکلئوتید مجاور که کاملا به DNA الگو متصل شده اند، با پیوند فسفودی استر به هم متصل شوند (Tooley et al., 2002) و با ۳۰-۲۵ سیکل، در انتها باندی به اندازه طول دو الیگونوکلئوتید حاصل خواهد شد (Osiowy., 2002). نکته قابل توجه در طراحی پرایمرهای LCR این است که برخلاف روش PCR، الیگونوکلئوتید ها باید به صورت جفت باشند (یعنی برای یک قطعه خاص مثلا ۲۰bp بایستی هم الیگونوکلئوتید Forward و هم الیگونوکلئوتید Reverse برای افزایش شدت باند طراحی گردد) و باید طوری طراحی شوند که کاملا در کنار هم قرار گیرند (Osiowy., 2002; Dahl et al., 2007). در این تحقیق، به منظور شناسایی موتاسیون های تک نوکلئوتیدی ناحیه YMDD ژن پلی مراز، روش LCR مورد استفاده قرار گرفت. از مزایای این روش نسبت به سایر روش ها، می توان به صرفه جویی در هزینه و وقت بیمار اشاره کرد.

Archive of SID

مواد و روش ها

جامعه مورد پژوهش

در طی پروژه قبلی (Bahramali et al., 2008)، ۱۲۰ نمونه سرم HBsAg مثبت از مراجعه کنندگان به مرکز طبی هپاتیت ایران و بیمارستان نمازی شیراز در طی سال های ۸۴-۸۳ جمع آوری شد. استخراج DNA ویروسی با استفاده از کیت nano-particle magnetic beads kit (BILATEC AG, Viernheim, Germany) از ۶۲ بیمار که در گروه بیماران دارای هپاتیت B مزمن، افراد مبتلا به سیروز، هپاتوسلولار کارسینوما و ناقلین بدون علامت طبقه بندی شده بودند و دارای موتاسیون در نواحی مختلف ژن پلی مراز ویروس، ناحیه Pre-core و core بودند، صورت گرفت و فرم پرسش نامه کامل بیماران که شامل وضعیت بالینی، آزمایشات کبدی، سرولوژی و میزان DNA ویروسی می باشد، برای تمامی نمونه ها دریافت گردید و در نهایت بعد از انجام Nested PCR، از محصولات آن ها در این تحقیق استفاده شد.

واکنش زنجیره ای لیگازی

به منظور بررسی موتاسیون در ناحیه YMDD ژن پلی مراز ویروس HBV، ۳ جفت الیگونوکلئوتید نرمال و موتان بوسیله نرم افزار gene runner (Hasting Soft Wair Inc) طراحی و از شرکت تکاپو زیست خریداری شد (جدول ۲). جهت بهینه سازی روش LCR، زمان Annealing، غلظت ssDNA، غلظت نمونه و تعداد سیکل مورد ارزیابی قرار گرفت. مواد تشکیل دهنده واکنش LCR متشکل از یک ماکرولیتر DNA الگو (با غلظت ۱۰۰ng/ml یا کمتر، به طوری که این روش با یک مولکول DNA الگو هم دارای پاسخ است)، ۴۰ng/ml از

1-Direct Sequencing
2-Restriction Fragment Lengh Polymerase
3-Line Probe Assay

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص موتاسیون تک نوکلئوتیدی در ناحیه YMDD ژن پلی مراز با استفاده از تکنیک LCR

نام پرایمر	اندازه پرایمر	توالی پرایمر
1- Forward	26bp	P5´- CGCATTGCCTGGCGTTTAGCTATATG -3›OH
1- Reverse	26bp	P5´- CATATAGCTAAACGCCAGGCAATGCG -3´OH
1-Mut- Forward	26bp	P5´- CGCATTGCCTGGCGTTTAGCTATATT -3´OH
1- Mut- Reverse	26bp	P5´-AATATAGCTAAACGCCAGGCAATGCG -3´OH
2- Forward	21bp	P5´- GATGATGTGGTGCTGGGCGCG -3´OH
2- Reverse	21bp	P5´- CGCGCCCAGCACCACATCATC -3´OH

پرایمرهای ۲-F، ۱-R، ۱-F و ۲-R یا ۱-Mut-F، ۱-Mut- ۱-R، ۲-F و ۲-R، ۲,۵ ماکرولیتر از بافر LCR۱۰X ، ۸ واحد آنزیم (۴۰،۰۰۰ u/ml) Termostable Taq DNA Ligase، ۴µg/µl از SS DNA Salmon sperm DNA و اضافه نمودن آب مقطر استریل تا به حجم کلی ۲۵µl برسد. واکنش زنجیره ای لیگازی LCR در دستگاه CORBETT آلمان مدل CG۱-۹۶ انجام شد. دمای واسرشته شدن اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و دمای اتصال اولیه ۶۴/۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه تنظیم شد و به دنبال آن ۳۰ سیکل واکنش لیگازی به شرح زیر انجام شد: واسرشته شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و اتصال در دمای ۶۴/۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه در نظر گرفته شد. محصولات LCR روی ژل آگارز ۲/۵ درصد که با استفاده از بافر TBE x ۰/۵ (شامل ۰/۵mM EDTA با pH=۸ و Tris/Borate ۴۴/۵ mM) ساخته شده بود، الکتروفورز گردید و نهایتا با رنگ اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و با نور UV مورد بررسی قرار گرفت.

www.SID.ir

یافته ها

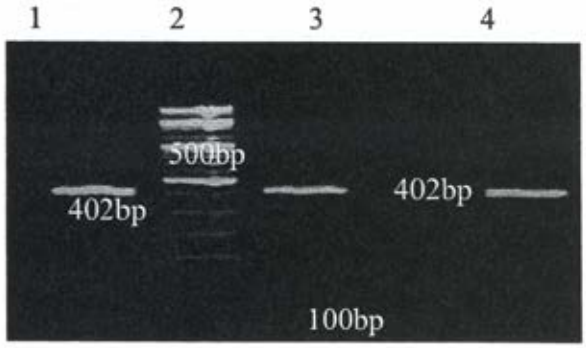
طبق گزارش قبلی از ۱۲۰ نمونه سرمی HBsAg مثبت، پس از آزمایش Nested PCR مشخص شد که ۶۲ نفر دارای موتاسیون در نواحی مختلف ژن پلی مراز ویروس، pre-core و core بودند (Bahramali et al., 2008). نتیجه واکنش Nested PCR تکثیر قطعه bp ۴۰۲ بود که در شکل ۱ نمایش داده شده است. این ناحیه شامل موتیف YMDD ناحیه ژن پلی مراز ژنوم ویروس است، در نتیجه از این محصول PCR برای مطالعه موتاسیون مورد نظر استفاده گردید. کلیه نتایج بدست آمده در مورد تشخیص موتاسیون موجود در ناحیه YMDD ژن پلی مراز با استفاده از تکنیک LCR به شرح ذیل می باشد، بررسی تکثیر DNA ویروسی نرمال با پرایمرهای نرمال با توجه به شکل ۱، نتایج حاصل از LCR برای ناحیه YMDD با پرایمرهای نرمال و نمونه نرمال در ناحیه فوق، تشکیل یک باند ۴۷bp است که حاصل اتصال الیگونوکلئوتیدهای (۱-F و ۱-R) به طول bp ۲۶ با الیگونوکلئوتیدهای دیگر (۲-F و ۲-R) به طول ۲۱bp بود.

بررسی تکثیر DNA ویروسی نرمال با پرایمرهای نرمال و موتان

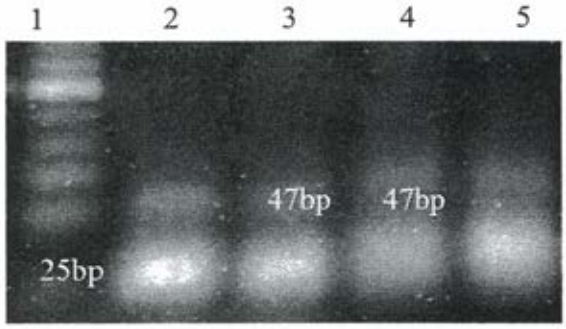
با توجه به شکل ۲، نتایج حاصل از LCR برای ناحیه YMDD با پرایمرهای نرمال و نمونه نرمال در ناحیه فوق، تشکیل یک

Archive of SID

نواحی مورد نظر) نباید مشاهده می شود. علت آن این است که افراد مبتلا به هپاتیت B، مخلوطی از گونه های نوع وحشی ویروس را همراه گونه موتان دارا می باشند. در نتیجه، برای بررسی موتاسیون در نواحی مختلف ژنوم ویروس از جمله ناحیه پلی مراز ژنوم ویروس از طریق روش LCR با طراحی پرایمرهای نرمال در نواحی مورد نظر مناسب نیست و مراحل بعدی مطالعات تشخیصی بر مبنای پرایمرهای موتان قرار داده شد.



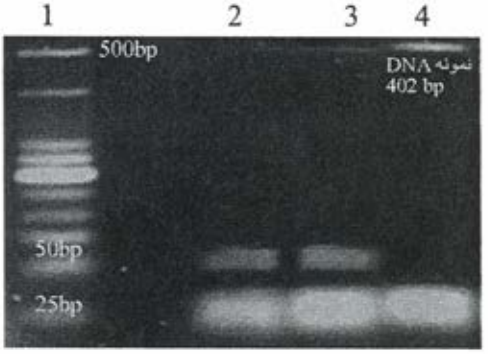
شکل ۱- نتیجه حاصل از Nested PCR بر روی ژن پلی مراز ویروس هپاتیت B.
ردیف ۱- محصول PCR (۴۰۲bp)، ردیف ۲- مارکر (Fermentaz) bP ۱۰۰، ردیف ۳- محصول PCR (۴۰۲bp)، ردیف ۴- محصول PCR (۴۰۲bp).



شکل ۳ - نتایج حاصل از LCR با استفاده از جفت پرایمرهای موتان و نرمال و نمونه دارای موتان در ناحیه YMDD.

ردیف-۱ مارکر ۲۵/۱۰۰ bp
ردیف-۲ LCR برای ناحیه YMDD با پرایمرهای موتان و نمونه موتان ۱
ردیف-۳ LCR برای ناحیه YMDD با پرایمرهای نرمال و نمونه موتان ۱
ردیف-۴ LCR برای ناحیه YMDD با پرایمرهای موتان و نمونه موتان ۲
ردیف-۵ LCR برای ناحیه YMDD با پرایمرهای نرمال و نمونه موتان ۲

برای تایید نتایج آزمایش قبلی، DNA نرمال با پرایمرهای نرمال و موتان، LCR گردید. نتایج حاصل از این آزمایش نشان دهنده آن است که پرایمرهای نرمال بصورت اختصاصی به DNA نرمال متصل می شود و DNA نرمال توسط پرایمرهای موتان تکثیر نمی گردد (شکل ۴، ردیف ۳). بنابراین نتایج منعکس کننده اتصال اختصاصی پرایمرها به جایگاه خود و تایید نتایج شکل قبلی می باشد.

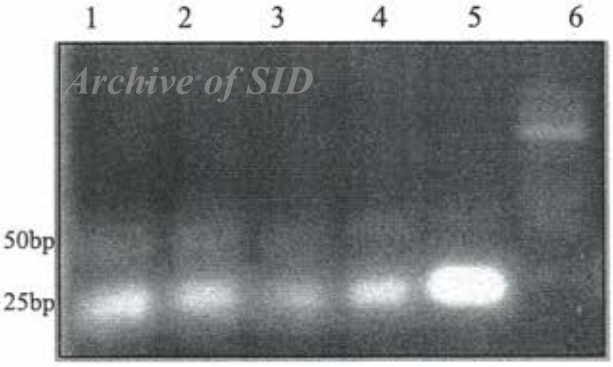


شکل ۲ - نتیجه ارزیابی ناحیه YMDD از طریق روش LCR.

ردیف ۱- مارکر ۲۵/۱۰۰bp، ردیف ۲- LCR برای ناحیه YMDDبا پرایمرهای نرمال و نمونه نرمال ۱، ردیف۳- LCR برای ناحیه YMDD با پرایمرهای نرمال و نمونه نرمال ۲ و ردیف ۴- کنترل منفی (بدون آنزیم).

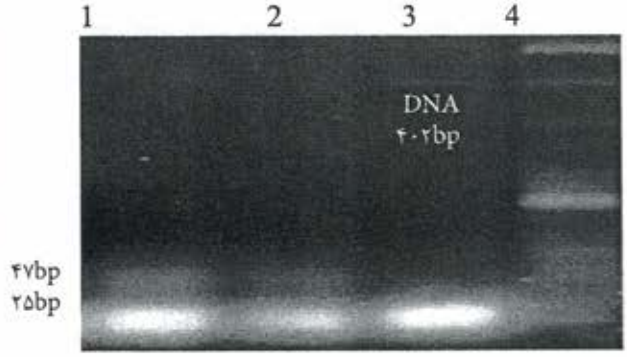
باند ۴۷bp است که حاصل اتصال الیگونوکلئوتیدهای (F-۱ و R-۱) به طول ۲۶bp با الیگونوکلئوتیدهای دیگر (F-۲ و R-۲) به طول ۲۱bp بود. بررسی تکثیر DNA موتان بیمار با پرایمرهای نرمال و موتان جهت اطمینان از اتصال اختصاصی (Spe-cific) پرایمرهای موتانت به DNA موتان بیماران و متصل نشدن پرایمرهای نرمال به DNA فرد موتان، آزمایش LCR با شرایط ذکر شده انجام گردید و نتایج زیر طبق شکل ۳ حاصل گردید. طبق شکل ۳ هر دو جفت پرایمر نرمال و موتان به DNA موتان متصل گردیدند (ردیف۲، ۳، ۴ و ۵)، در صورتی که اتصال جفت پرایمر نرمال در مورد نمونه های موتان (در

www.SID.ir



Archive of SID

شکل ۶- نتایج بررسی نمونه های موتان با پرایمر موتان جهت تشخیص موتاسیون در ناحیه YMDD.
ردیف ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- LCR با نمونه های موتان مختلف و پرایمر موتان برای ناحیه YMDD و ردیف ۶-مارکر 25bp

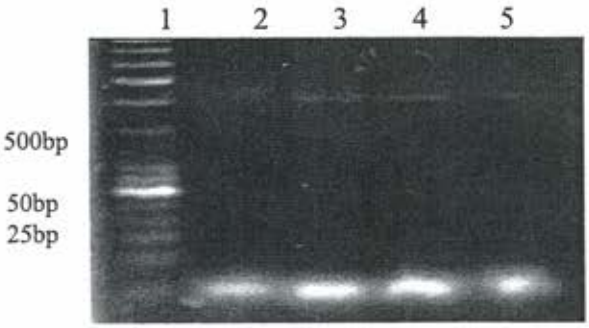


شکل ۴- نتایج حاصل از LCR از طریق پرایمرهای نرمال و موتان در ناحیه YMDD با نمونه نرمال۱ و نمونه موتان ۱

ردیف۱- LCR برای ناحیه YMDD با پرایمرهای نرمال و نمونه موتان ۱،
ردیف۲- LCR برای ناحیه YMDD با پرایمرهای نرمال و نمونه نرمال ۱،
ردیف۳- LCR برای ناحیه YMDD با پرایمرهای موتان و نمونه نرمال ۱ و
ردیف۴-مارکر .۲۵/۱۰۰bp

نتایج بررسی میزان موتاسیون موجود در ناحیه YMDD ژن پلی‌مراز ویروس HBV در نمونه های بیمار با استفاده از پرایمرهای موتان از طریق تکنیک LCR

با توجه به نتایج بدست آمده تصمیم به تکثیر ناحیه YMDD با یک جفت پرایمر موتان گردید. ناحیه پلی‌مراز ویروس در موتیف YMDD (ناحیه ای که بیشترین ارتباط را با مقاومت دارویی لامیوودین داراست) در ۵۱ بیمار (۸۲/۲۵٪) بدون موتاسیون (شکل ۵) و در ۱۱ بیمار (۱۷/۷٪)، موتاسیون شایع YIDD که معمولا ۲-۳ سال لامیوودین دریافت کرده بودند، مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۵ - نتایج بررسی نمونه های نرمال با پرایمرهای موتان
ردیف ۱-مارکر 25bp
ردیف ۲، ۳، ۴، ۵- LCR با نمونه نرمال و پرایمر موتان برای ناحیه YMDD.

www.SID.ir

بحث

علی رغم شیوع هپاتیت B و اهمیت این بیماری در ایران، مطالعات اندکی بر روی این ویروس صورت گرفته است. با توجه به اهمیت بیماری و بررسی های به عمل آمده مبنی بر شیوع و موتاسیون در نواحی مختلف ژنوم ویروس مورد نظر در جهت فرار از سیستم های دفاعی میزبان، تشخیص و همچنین مقاومت در برابر دارو، در مناطق و کشورهای مختلف جهان و همچنین ارتباط این تغییرات ژنومی با پیشرفت بیماری های کبدی و اثر آن بر روی سیر بیماری زایی و پاسخ به درمان همچون موتاسیون در ناحیه YMDD ژن پلی مراز در اثر مصرف طولانی مدت داروی لامیوودین و مقاومت نسبت به آن، ما را برآن داشت که مطالعات خود را بر مبنای این ویروس و تشخیص این موتاسیون قرار دهیم. در این گزارش روش LCR برای مطالعه و تشخیص موتیف YMDD در ژنوم DNA پلی مراز ویروس HBV، بدون استفاده از تکنیک تعیین توالی که زمان بر و هزینه بر است، اقدام گردید. نکته حائز اهمیت در این روش، بهینه سازی شرایط LCR بود که با توجه به مطالعات گذشته و در حین تحقیق بدست آمد. محققینی به نام های Tooley و Barany نشان دادند که حساسیت PCR-LCR از LCR بیشتر می باشد. به همین دلیل برای انجام LCR از ۶۲ نمونه محصول PCR استفاده گردید (DNA هدف بیشتری در اختیار داشته باشیم). روش LCR برای یک دقیقه لیگاسیون جواب نداد و لذا زمان لیگاسیون ۴ دقیقه قرار داده شد و باند

Archive of SID

موردنظر مشاهده گردید، بنابراین در LCR زمان لیگاسیون بسیار مهم بوده و باید بهینه سازی گردد. در طراحی پرایمرها دقت لازم جهت یک اندازه بودن پرایمرها و داشتن دمای Annealing مشابه صورت گرفت تا مشکلی در LCR مشاهده نگردد. هر چند در مقالات منتشر شده تعداد سیکل های LCR را حداکثر ۲۰ سیکل ذکر نموده اند (Tooley et al., 2002) و لیکن در تحقیق حاصل، بهترین باند در ۳۰ سیکل بدست آمد. نکته قابل توجه در روش LCR این است که معمولا پرایمرها بر اساس DNA سالم طراحی می گردند، تا آن ها را تکثیر نمایند و اگر تغییر در حد یک باز در DNA الگو در ناحیه مورد نظر اتفاق افتد، آنزیم لیگاز نمی تواند باند فسفودی استری را بین دو الیگونوکلئوتید برقرار نموده و لذا بعد از پایان LCR برای نمونه بیمار موتاسیون دار باندی مشاهده نمی گردد. اما با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش مشخص شد که بیماران تحت درمان هپاتیتی هم حاوی ویروس تیپ وحشی HBV و هم ویروس موتاسیون دار، در ناحیه YMDD می باشند، بنابراین روش LCR بر مبنای تشخیص موتاسیون YMDD ژن پلی مراز با پرایمر موتان برای دو ناحیه قرار داده شد. جهت راه اندازی روش LCR از پرایمرهای نرمال و DNA نرمال استفاده شد و سپس برای تشخیص موتاسیون از پرایمرهای موتان دار استفاده گردید تا اگر باندی مشاهده گردد، مبنی بر آلوده بودن بیمار به نوع موتان دار ویروس تلقی گردد. این روش می تواند در تشخیص موتاسیون ها تک نوکلئوتیدی در کلیه بیماری های ژنتیکی بسیار حائز اهمیت باشد. به لحاظ اهمیت درمان بیماری هپاتیت B به جهت جلوگیری از پیشروی بیماری و امراض کبدی و با توجه به استفاده طولانی مدت داروهای ضد ویروسی جهت رسیدن به این مهم (شامل اینترفرون، لامیوودین و ...) و همچنین مشکلات شایع در مصرف دارو به جهت ایجاد مقاومت به ویروس، مطالعاتی در این زمینه در گذشته انجام گردیده بود که نشان می‌داد پس از یک سال لامیوودین تراپی، افزایش موتاسیون در موتیف YMDD ژن پلی‌مراز، ٪۳۲-۱۴ افزایش می‌یابد (Zhang et al., 2003) که در جمعیت مورد مطالعه با تکنیک LCR که به طور میانگین ۲ سال دارو دریافت کرده بودند (Bahramali et al., 2008)، موتاسیون در ۱۱ بیمار (٪۱۷/۷)، موتاسیون شایع YIDD مشاهده شد و ارتباط معنا داری نیز بین مصرف دارو و با تغییرات مربوطه بر روی این ناحیه از ژن یافت گردید که این نتایج نشان دهندهٔ افزایش موتاسیون در ناحیه مورد نظر در طی درمان و استفاده از داروی ضد ویروسی می‌باشد. بر طبق مطالعات گذشته (Suzuki et al., 2006) مصرف بیش از ۶ ماه تک دارویی لامیوودین باعث ایجاد مقاومت به درمان شده که نتایج حاصل مطالعات نیز حاکی از آن بود که کلیه افرادی که دچار تغییر در موتیف YMDD (YVDD, YIDD) شده بودند، بیمارانی را شامل می‌شدند که حداقل یک سال تحت درمان با داروی مربوطه بودند. جهت مقابله با ویروس فوق به نظر می‌رسد با تحت نظر گرفتن افراد مبتلا به ویروس که تحت درمان قرار گرفته اند و تشخیص سریع و به موقع موتاسیون ایجاد شده با مصرف طولانی مدت دارو در ژنوم ویروس به خصوص استفاده از تکنیک LCR که روشی آسان و ارزان برای تشخیص است و بررسی دقیق نقطه اثر دارو، طراحی داروهای جدید و استفاده همزمان از چند دارو به توان به این مهم دست یافت و استراتژی‌های جدیدی در جهت مدیریت درمان بیماران آلوده پیشنهاد نمود. لازم به ذکر است که با توجه به مصرف بلند مدت داروهای ضد ویروسی آنالوگی و خطر افزایش موتاسیون و جلوگیری از مصرف بیش از اندازهٔ این داروها می‌توان تست‌های شناسایی موتیف YMDD به خصوص تشخیص از طریق تکنیک LCR را هر ۳ ماه (بعد از هر دورهٔ کوتاه‌مدت درمان) به طور مرتب برای بیماران جهت بررسی این ناحیه توصیه نمود. در نهایت، جهت بررسی و مطابقت بیشتر و دقیق تر پیشنهاداتی به شرح ذیل ارائه می گردد. مقایسه تکنیک LCR با PCR-ELISA جهت بررسی موتاسیون های تک نوکلئوتیدی، به کارگیری روش LCR جهت مطالعه موتاسیون های مختلف موجود در ژنوم ویروس HBV، به دلیل آسان و ارزان بودن روش LCR می توان از آن برای تشخیص موتاسیون های در حد یک باز در بسیاری از بیماری های ژنتیکی انسانی استفاده کرد.

www.SID.ir

منابع

Archive of SID

Bahramali G, Sadeghizaheh M, Amini- Bavil-olyaee S, Alarian SM, Behzad-Behbahani A, Adeli A, Aghasadeghi MR, Amini S, Mahboudi F. Clinical, virologic and phylogenetic features of hepatitis B infection in Iranian patients. World gastroenterol, 2008; 14(35):5448-53.

Balakrishna P, Bozdayi M Pai R, Beker T, Sarioglu M, Turkyilmaz A, Grier J, Yurdaydin C and Schinazi R. Emergence of a Novel Mutation in the FLLA Region of Hepatitis B Virus drug lami vudine.Therapy Antimicrob Agents and Chemo, 2005; 49(7): 2618-2624.

Bosch V, Bartenaschlager R, Radziwill G, Schaller H. The duck hepatitis B virus P-gene codes for protein strongly associated with the 5-end of viral DNA minus strand. Virology, 1988; 166(2):475-485.

Chun-Tao W, Fontana R J. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes, variants and mutants. Clin Liver Dis, 2006; 8: 321-52.

Collier L, Balows A, Sussam M ,Topley and Wilson. Microbiology and microbial infections. 1998. 5th edition. Volume I. Arnold publication.

Conner BJR, eyes AA, Morin C, Itakura K, Teplitz RL and Wallace RB. CO-Dominant Genetic Diagnosis Test. Proc. Natl Acad Sci USA,1983; 80: 278-282.

Dahl F, Multigene amplification and massively parallel sequencing for cancer mutation discovery. Ampligase Thermostable DNA Ligase. Proc Natl Acad Sci, 2007; 104:938.

Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Fields virology, 2001;4rd ed. Philadelphia, Pa:Li ppincott-Raven Publishers. Pp:1521-1551.

Guatelli JC, Whitfield KM, Kwoh DY, Barringer KJ, Richman DD and Gingeras TR. Cell-free protein synthesis: methods and protocols. Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87, 1874-1878.

Hosseini SH, Sabahi F, Amini-Bavil-Olyaee S, Alavian SM and Merat S. Anovel accurate ACRS-PCR method with a digestion internal control for identification of wild type and YMDD mutants of hepatitis B virus strains. J Virolog Methods, 2006; 137:298-303.88.

Kew MC, Hepatitis viruses and hepatocellular carcinoma.Res Virol, 1998; 149:257-267.

Monjardino J. Molecular biology of hepatitis viruses, Imperial College Press, London, 1998.

Osiowy C. Sensitive detection of HBsAg mutants by Gap Ligase Chain Reaction Assay. 2002.

Sattler F, Rabinson WS. Hepatitis B viral DNA molecules havecohesive ends. J Virol, 1979; 32 (1) :226 -33.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. Science, 1988; 239: 487-491.

Stanley M, Lemon Arie J, Zuckerman. Viral Hepatitis, 1998; 3th edition:323-336.

www.SID.ir

Archive of SID

Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Yatsuji H, Sezaki H, Arase Y, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Ikeda K, Kobayashi M, Watahiki S and Kumada H. Changes in viral loads of lamivudine-resistant mutants during entecavir therapy. Hepatol Res, 2006.

Tooley PW, Hatziloukas E, Scott DL and Carras MM. Use of ligase chain reaction for enhanced detection of phytophthora infections.Can J. Plant pathol,2002; 24:294-301.

Valenzuela P, Gray P, Quiroga M, Zaldivar J, Goodman HM, Rutter WJ. Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. Nature,1979; 30; 280 :815-819.

Wu DY and Wallace RB. Genomics 4, 1989; 560-569.

Zhang X, Liu C, Gong Q, Zhang S, Zhang D, Lu Z, Wang Y. Evolution of wild type and mutantsof the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase during Lamivodine therapy. J Gastroenterol Hepatol, 2003; 18 (12):1353-1357.

www.SID.ir