ارزیابی روش Touchdown Nested PCR برای جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی و افزایش اختصاصیت در تکثیر ژنی ویروس های نقص ایمنی انسان و هپاتیت جی

شهاب فلاحی[*]
مهرداد روانشاد[**]
عذرا کنارکوهی[*]
رضا قنبری[*]
محبوبه حاجی‌عبدالباقی[***]

[*] کارشناس ارشد ویروس‌شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، دانشکده علوم پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، گروه ویروس‌شناسی پزشکی
[**] دکترای ویروس‌شناسی پزشکی، استادیار دانشگاه تربیت مدرس تهران، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی پزشکی
[***] متخصص بیماری‌های عفونی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان امام خمینی(ره)،گروه بیماری‌های عفونی

تاریخ وصول:۱۳۸۸/۹/۱۷
تاریخ پذیرش:۱۳۸۸/۱۰/۱۳

مؤلف مسئول:مهرداد روانشاد
پست‌الکترونیک:Ravanshad@modares.ac.ir

چکیده:

مقدمه و هدف: یکی ازپارامترهای مهمی‌که درواکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای برای بهینه‌سازی می‌توان در نظر گرفت، دمای دورگه شدن پرایمر با DNA الگو می‌باشد. یکی از تغییرات صورت گرفته در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معمولی استفاده از روش Touchdown PCR است که بر خلاف برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معمولی و استاندارد که از یک دمای اتصال ثابت برای تکثیر توالی استفاده می‌شود، در این روش محدوده‌ای از درجه حرارت‌های اتصال استفاده می‌شود. مطالعهٔ حاضر به منظور ازریابی کارایی روش Touchdown Nested PCR برای جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی و افزایش اختصاصیت در تکثیر ژنی طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها: این یک مطالعه تجربی است که طی سال‌های ۱۳۸۸ ـ ۱۳۸۷ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. نمونه‌های جمعیت مورد بررسی در این مطالعه، ۳۵ مورد پلاسمای بیماران آلوده به ویروس هپاتیت جی و ۳۵ مورد پلاسمای بیماران آلوده به ویروس نقض ایمنی انسان بودند . بعد از استخراج اسید نوکلئیک، طراحی پرایمرهای مورد نظر برای دو ویروس نقص ایمنی انسان و هپاتیت جی و ساخت cDNA ، روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای به دو صورت استاندارد و Touchdown بر روی نمونه‌های کنترل مثبت و منفی انجام شد.

یافته‌ها: در تمامی نمونه‌های مثبت باند مورد نظر مشاهده شد، در حالی که در هیچ یک از نمونه‌های کنترل منفی انسانی و ویروسی هیچ باندی مشاهده نشد. در نمونه‌های مثبت با روش استاندارد، پس از الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، باندهای غیر اختصاصی به ویژه در نمونه‌های ویروس نقص ایمنی انسان و به مقدار کمتری در نمونه های ویروس هپاتیت جی مشاهده شد. پس از اجرای پروسهٔ Touchdown میزان باندهای ناخواسته و غیر اختصاصی، تا حد زیادی کاهش یافت و یا کاملاً حذف شد.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر علی‌رغم شکل‌گیری باندهای ناخواسته در واکنش استاندارد، با اجرای پروسهٔ Touchdown باندهای اضافی بدون این که اثر منفی در میزان محصول نهایی ایجاد شود، به میزان قابل توجهی کاهش یافتند. با توجه به سادگی این روش و نیز عدم ایجاد هزینه و مراحل کاری اضافی به نظر می‌رسد که استفاده از این پروتکل برای بهینه‌سازی سریع واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز، روشی منطقی و به صرفه باشد.

واژه‌های کلیدی: Touchdown Nested PCR ، اتصالات غیراختصاصی، افزایش اختصاصیت، تکثیر ژنی

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[1] رایج‌ترین تکنیک مورد استفاده در آزمایشگاه‌های مولکولی است که برای تکثیر یک توالی اختصاصی به کار می‌رود(۱). این روش منجر به تولید مقدار زیادی از توالی اولیه، به منظور دستکاری‌های مولکولی یا اهداف تشخیصی می‌گردد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یک روش سریع و آسان برای تکثیر ژنی ایجاد می‌کند و در بسیاری از موارد دارای فواید اثبات شده‌ای برای آزمایش بالینی طیف وسیعی از عفونت‌های بیماری‌زا از قبیل ویروس عامل سندرم اکتسابی نقص ایمنی انسانی[2] نسبت به دیگر روش‌های مورد استفاده رایج در آزمایشگاه است(۳ و ۲).

تشخیص ویروس‌های با ژنوم RNA نیازمند روش‌های بسیار حساس و با قدرت تشخیص بالا است که این امر به دلیل دوز عفونی پایین بسیاری از ویروس‌ها و در نتیجه نیازمندی به روش‌های بررسی با قدرت تشخیص تعداد کپی‌های بسیار کم ویریون در نمونه‌های بیماران است(۵ و۴). دستیابی به این سطح از حساسیت، امروزه به عنوان یک چالش اساسی برای روش‌های مولکولی و مخصوصاً برای تشخیص ویروس‌های RNA دار مطرح می‌باشد، چرا که این ویروس‌ها نیازمند یک مرحله اضافی رونویسی معکوس در پروسه تشخیص هستند. تکثیر از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای[3] تا حدی منجر به بهبود حساسیت تشخیص شده است(۷ و ۶).

روش‌های جدیدی بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسعه یافته‌اند(۹ و ۸). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای روشی است که در آن از دو جفت آغاز گر برای تکثیر توالی مورد نظر استفاده شود(۱۲ ـ ۱۰). در ابتدا جفت اول پرایمرها ناحیه‌ای خارج از توالی مورد نظر را تکثیر می‌کنند و سپس جفت دوم به نواحی داخلی‌تر محصولات اولیه متصل شده و ناحیهٔ مورد نظر را تکثیر می‌کنند، بنا بر این هم حساسیت و هم اختصاصیت روش افزایش می‌یابد(۱۳ و ۱۰). پارامترهای مهمی که در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای برای بهینه‌سازی می‌توان در نظر گرفت، شامل؛ دمای دورگه شدن پرایمر با DNA الگو، تعداد سیکل‌های مورد استفاده در هر دو راند، غلظت پرایمرها، یون منیزیوم، بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای و بهره‌گیری از مکمل‌ها می‌باشند(۱۵ و ۱٤). روش‌هایی مانند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای، واکنش زنجیره لیگاز[4] و زنجیره DNA منشعب[5] که بر اساس عمل بر روی DNA کار می‌کنند، از لحاظ عملکردی بستگی کامل به اتصال پرایمرها به توالی هدف دارند(۱۶).

یکی از تغییرات صورت گرفته در روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معمولی استفاده از روش Touchdown PCR است که برخلاف برنامه PCR معمولی و استاندارد که از یک دمای اتصال ثابت برای تکثیر استفاده می‌شود، در Touchdown PCR محدوده‌ای از درجه حرارت‌های اتصال استفاده می‌شود. در این نوع

1-Polymerase Chain Reaction (PCR)
2-Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)
3-Nested PCR
4-Ligase Chain Reaction.(LCR)
5-branched DNA

Archive of SID
www.SID.ir

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در سیکل‌های اولیه درجه حرارت اتصال بالا می‌باشد که در سیکل‌های بعدی درجه حرارت اتصال در هر سیکل یک درجه کاهش پیدا می‌کند، به طوری که در ۱۰ سیکل آخر درجه حرارت اتصال ثابت باقی می‌ماند. این کاهش متوالی درجه حرارت اتصال سبب می‌شود که بهترین درجه حرارت اتصال پرایمر ـ هدف انتخاب شود. در این نوع واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در دمای بالا، اتصال پرایمر به الگو و در نتیجه محصولات تولید شده، کاملاً اختصاصی و دقیق است، سپس همان‌طورکه درجه حرارت کاهش می‌یابد پرایمرها به سکانس‌های غیراختصاصی باند می‌شوند و محصولات غیراختصاصی به وجود می‌آورند، ولی این محصولات نسبت به محصولات اختصاصی بسیار کم می‌باشند و نمی‌توانند تأثیر چندانی در کیفیت محصول نهایی ایجاد کنند. روش Touchdown Nested PCR اغلب برای ساده کردن مراحل تعیین درجه حرارت اتصال در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به کار می‌رود(۲۱ ـ۱۷).

مطالعهٔ حاضر به منظور ارزیابی کارایی روش Touchdown Nested PCR برای جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی و افزایش اختصاصیت در تکثیر ژنی طراحی و انجام شد.

مواد وروش‌ها

این یک مطالعه تجربی است که طی سال‌های ۱۳۸۸ ـ ۱۳۸۷ در دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. نمونه‌های جمعیت مورد بررسی در این مطالعه بیماران آلوده به ویروس هپاتیت جی[1] و نقص ایمنی انسان[2] بودند. اجرای این تحقیق به تصویب کمیته ایمنی‌زیستی و اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسید. هم‌چنین فرم رضایت‌نامه برای کلیه بیماران شرکت کننده در تحقیق تهیه و تکمیل شد. تعداد ۳۵ نمونه خون از هر کدام از افراد آلوده به ویروس نقص ایمنی انسان و ویروس هپاتیت جی به ترتیب از مرکز تحقیقات ویروس نقص ایمنی انسان بیمارستان امام خمینی و مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان شریعتی تهران تهیه شدند. مثبت بودن نمونه‌ها برای ویروس نقص ایمنی انسان و هپاتیت جی قبلاً به ترتیب با روش‌های وسترن بلات و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تأیید شده بود. حدود ۱۰ سی‌سی خون محیطی از بیماران گرفته شده و در لوله‌های استریل حاوی ماده ضدانعقاد EDTA ریخته شد. کلیه نمونه‌ها بعد از تهیه شدن در فریزر ۸۰ ـ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

RNA ویروس از ۱۴۰ میکرولیتر پلاسما با استفاده از کیت استخراج RNA کیاژن(آمریکا) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج و پس از آن کنترل کیفی انجام شد.

به منظور ارزیابی کامل روش مورد نظر از یک سری پرایمر معمولی برای ناحیه UTR ویروس هپاتیت جی و از یک سری پرایمر ناهمخوان[3] مربوط به ژن

1-Hepatitis G Virus (GBV-C)
2-Human Immunodeficiency Virus (HIV)
3-Degenerate

www.SID.ir
Archive of SID

پوشش[1] ویروس نقص ایمنی انسان برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای استفاده شد. پرایمرها بر اساس اصول استاندارد طراحی پرایمر و با استفاده از نرم افزارهای الیگوآنالیزر[2]، الیگو۶[3] و ژن رانر[4] جهت آنالیز ویژگی‌های ساختاری و ترمودینامیکی طراحی شدند. پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار بلاست[5] مورد آنالیز قرار گرفتند.

توالی اسید نوکلئیک پرایمرهای مورد استفاده به شرح زیر می باشند؛ پرایمرهای مورد استفاده برای HIV به صورت خارجی پیشرو: 5′-CCA ATT CCY ATA CAT TAY TGT GCC-3′، خارجی پیرو: 5′-TGT TRA ATG GCA GTC TAG CAG-3′، داخلی پیشرو: 5′-RAT GGG AGG GGC ATA YAT TG-3′ و داخلی پیرو: 5′-RAT GGG AGG GGC ATA YAT TG-3′ و پرایمرهای مورد استفاده برای HGV به صورت: خارجی پیشرو: 5′-GGTCGTAAATCCCGGTCACC-3′، خارجی‌پیرو: 5′-CCCACTGGTCCTTGTCAACT-3′، داخلی پیشرو: 5′-TAGCCACTATAGGTGGGTCT-3′′ و داخلی پیرو: 5′-ATTGAAGGGCGACGTGGACC-3′ بودند.

برای ساخت cDNA ابتدا قسمتی از RNA ژنومی به وسیله یکی از پرایمرها شناسایی و هیبرید شد و سپس آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، پرایمر مورد نظر را شناسایی و با استفاده از بافر، dNTP و رشته الگو، شروع به طویل‌سازی و ساخت رشته نمود.

برای انجام پروسه ۵ میکرولیتر RNA مورد نظر با استفاده از آنزیم M-MLV ساخت شرکت پرومگا(آمریکا)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل شد.

تمام مراحل انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زیر هودکلاس II انجام و حجم نهایی واکنش‌های انجام گرفته ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. برای واکنش دور اول و دوم از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، محلول 1X بافر، کلرید منیزیم با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار، مخلوط نوکلئوتیدها[6] با غلظت ۰/۲ میلی‌مولار، مقدار ۳/۷۵ پیکومول از پرایمرهای خارجی، ۰/۲۵ میکرولیتر از آنزیم پلی‌مراز Taq، ۵ میکرولیتر DNA الگو (ژنوم ویروس) به میکروتیوب واکنش اضافه شد و حجم نهایی با آب مقطر دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد.

در دور اول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، مخلوط بالا در دستگاه ترموسایکلر قرار داده و این برنامه برای آن اعمال شد؛ دمای اولیه جدا شدن دو رشته الگو ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دمای جدا شدن دو رشته الگو ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه برای هردو ویروس، دمای اتصال پرایمر به الگو ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، دمای پیشروی ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه و ۳۰ سیکل از مرحله ۲ تا ۴ تکرار شد. دمای پیشروی نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه در نظر گرفته شد.

1-Envelope
2-Oligo Analyzer
3-Oligo6
4-Gene Runner
5-BLAST
6-dNTPs

Archive of SID
www.SID.ir

پروسه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دور دوم طبق این برنامه انجام شد. دمای جدا شدن اولیه دو رشته الگو ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، دمای جدا شدن دو رشته ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای جفت شدن پرایمر با الگو ۶۴ درجه به مدت ۳۵ ثانیه، دمای پیشروی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، ۲۵ سیکل از مرحله ۲ تا ۴ تکرار شد، دمای پیشروی نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه بود.

برنامه دمایی واکنش Touchdown PCR برای ویروس نقص ایمنی انسان به این شرح بود؛ واسرشتی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴ دقیقه، واسرشتی ثانویه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه و گسترش به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. سپس ۸ مرحلهٔ دیگر که هر کدام شامل ۳ دور، با دمای واسرشتی و گسترش مشابه مرحلهٔ اول بودند انجام شد، در حالی که دمای اتصال در هر مرحله یک درجه نسبت به مرحله قبل از خود کاهش می‌یافت به صورتی که دمای اتصال در ۳ دور نهایی به ۵۳ درجه سانتی‌گراد رسید. در پایان، یک مرحلهٔ گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه انجام شد.

واکنش Touchdown PCR برای ویروس هپاتیت جی به این شرح بود؛ واسرشتی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، واسرشتی ثانویه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۵ ثانیه و گسترش به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد اعمال شد. سپس۵ مرحلهٔ دیگر که هر کدام شامل ۵ ـ۴ دور، با دمای واسرشتی و گسترش مشابه مرحلهٔ اول بودند، انجام شد. در حالی که دمای اتصال در هر مرحله دو درجه نسبت به مرحله قبل از خود کاهش یافت به صورتی که دمای اتصال در ۴ دور نهایی به ۶۲ درجه سانتی‌گراد رسید. در پایان، یک مرحلهٔ گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام شد.

در مرحله آخر محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به وسیله الکتروفورز برروی ژل آگارز ۲ درصد جداسازی و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم برماید در حضور نوراشعه ماوراء بنفش آشکارسازی شدند. محصولات واکنش به منظور تأیید نتایج، برای تعیین توالی به آزمایشگاه بیمارستان طالقانی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران ارسال شدند.

یافته‌ها

پس از بهینه‌سازی اجزای واکنش، روش طراحی شده برروی ۳۵ نمونه مثبت ویروس هپاتیت جی و ویروس نقص ایمنی انسان، ۵ کنترل منفی ژنوم انسانی و ۵ نمونه از هرکدام از ویروس‌های هپاتیت بی، ویروس TT و هپاتیت سی به عنوان کنترل منفی ویروسی انجام شد.

در تمامی نمونه‌های مثبت باند مورد نظر مشاهده شد، در حالی که در هیچ یک از نمونه‌های کنترل منفی انسانی و ویروسی هیچ باندی مشاهده

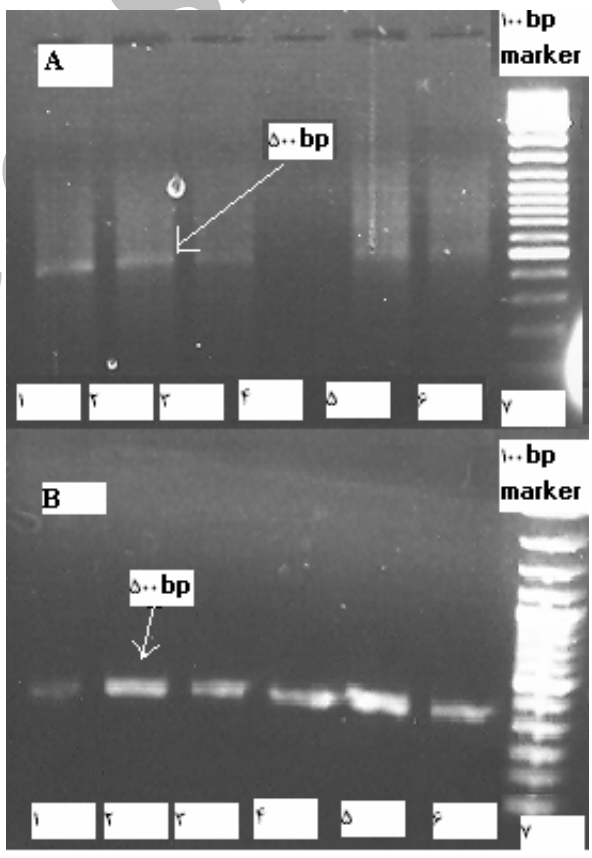
Archive of SID

www.SID.ir

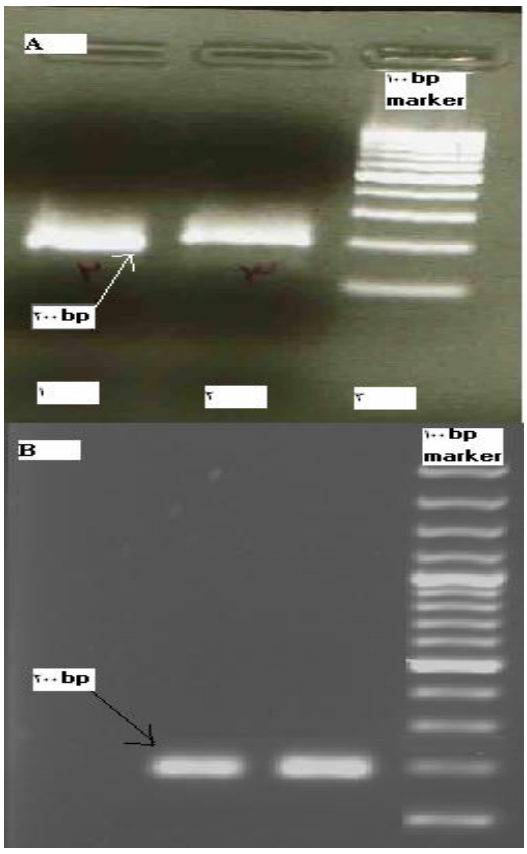
نشد. در نمونه‌های مثبت با روش استاندارد، پس از الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، باندهای غیر اختصاصی به ویژه در نمونه‌های ویروس نقص ایمنی انسان و به مقدار کمتری در نمونه‌های ویروس هپاتیت جی مشاهده شد. پس از اجرای پروسهٔ Touchdown میزان باندهای ناخواسته وغیر اختصاصی، تا حد زیادی کاهش یافت ویا کاملاً حذف شد(تصاویر ۱ و ۲). قابل ذکر است که اجرای پروسهٔ Touchdown در موارد زیادی موجب بهبود کیفیت باندهای مشاهده شده گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اثبات کارایی برنامه Touchdown در افزایش دقت و حساسیت روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مطالعه‌های متعدد(۱۹ــ ۱۷)، هدف از این مطالعه راه‌اندازی و بهینه‌سازی یک پروتکل Touchdown برای تکثیر ژنومی ویروس‌های نقص ایمنی انسان و هپاتیت جی بود.



تصویر ۱: A؛ محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای استاندارد، B؛ محصولات Touchdown Nested PCR ، ۶ـ ۱؛ نمونه‌های ویروس نقص ایمنی انسان، ۷؛ *مارکر ۱۰۰ bp*



تصویر ۲: A؛ محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای استاندارد، B؛ محصولات Touchdown Nested PCR ، ۲ـ ۱؛ نمونه‌های ویروس هپاتیت جی، ۳ ؛ *مارکر ۱۰۰ bp*

www.SID.ir

یک مشکل عمده و رایج در تکثیر ژن‌ها با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، خصوصاً در مورد ژنوم‌های پیچیده، ظهور باندهای کوچک ناخواسته در طیف محصولات مورد نظر است. این پدیده به طور معمول به علت اتصال نادرست یک یا هر دو پرایمر مورد استفاده به الگوی هدف یا از یک منبع آلودگی خارجی یا داخلی رخ می‌دهد(۲۲و ۱۷). در موارد زیادی این محصولات فرعی به دلیل شانس بیشتر تکثیر قطعات کوچک‌تر نسبت به توالی‌های بزرگ‌تر در واکنش، از نظر مقدار نهایی برتری می‌یابند. به طور معمول برای غلبه بر این مسئله از کاهش مقدار منیزیم و افزایش دمای اتصال استفاد می‌شود که اغلب وقت‌گیر و پرهزینه هستند(۱۷). آنالیز ژنوتیپی ویروس نقص ایمنی انسان مقاوم به دارو، یک فاکتور اساسی برای اجرای برنامهٔ درمان چندارویی است. با توجه به اهمیت موضوعاتی از این قبیل و مشکلات تکثیر ژنی برای تشخیص این ویروس، حتی در تیتر بالای ۱۰۰۰ کپی در میلی لیتر، یافتن راهی برای تکثیر حساس و اختصاصی این ویروس، یک نیاز اساسی است(۲۳).

Touch Down PCR روشی است که در آن واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ابتدا از دمای بالا شروع می‌شود و در ادامه به تدریج دمای اتصال کاهش می‌یابد، بدین ترتیب در دمای بالای اولیه که اتصال پرایمر به ناحیه غیر اختصاصی دشوار می‌باشد فقط محصول خالص اولیه تولید می‌شود و در نتیجه چون قطعه اختصاصی اتصال پرایمر در محیط واکنش به نسبت خیلی بیشتر می‌باشد، حتی با پایین آمدن دما در ادامه کار، شانس اتصال به نواحی غیر از نواحی اصلی اتصال اصلی بسیار کم می‌شود(۱۸). ثابت شده است که تمامی‌مشکلات مربوط به اتصال نامناسب پرایمر به آسانی به وسیله کاهش تدریجی دمای اتصال برطرف می‌شوند. این روش تنها به توالی‌های بسیار اختصاصی و همراه با افزایش حساسیت و کارایی اجازه تکثیر می‌یابد(۲۴).

یک روش فرعی سریع برای اجرای پروسه‌های وقت‌گیر بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز می‌تواند استفاده از کاهش مرحله‌ای دمای اتصال پرایمرها در واکنش تا حدود دمای اتصال استاندارد و اتصال به صورت تدریجی باشد. مطالعه‌های متعددی قدرت عملکردی Touchdown PCR را تأیید کرده‌اند(۲۶ و ۲۴، ۲۱، ۱۸). Touchdown PCR یکی از انواع استاندارد تغییرات ایجاد شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز است که باعث افزایش حساسیت و اختصاصیت واکنش می‌شود(۲۴). این روش یک پروسه یک مرحله‌ای ساده و سریع برای بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به منظور افزایش اختصاصیت در زمانی است که دمای اتصال پرایمر به الگو دقیقاً معلوم نیست(۲۱، ۱۸).

کوچک‌ترین اختلاف بین دمای درست و نادرست اتصال پرایمر، قادر به ایجاد اختلافی در حد دو برابر است که در هر سیکل به طور تصاعدی افزایش می‌یابد. Touchdown PCR کاربردهای زیادی در پروتکل‌های استاندارد واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از

Archive of SID

www.SID.ir

قبیل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس[1] برای ساخت کتابخانه‌های cDNA و غربالگری SNP ها پیدا کرده است. Touchdown PCR به طور اختصاصی برای نمونه‌هایی مفید است که تکثیر آنها مشکل است، اما به طور معمول برای افزایش حساسیت و تشکیل محصولات نیز به کار می‌رود(۱۸).

در مطالعهٔ حاضر علی‌رغم شکل‌گیری باندهای ناخواسته در واکنش استاندارد، با اجرای پروسهٔ Touchdown بدون این که اثر منفی در میزان محصول نهایی ایجاد شود باند اضافی حذف شد.

با توجه به سادگی این روش و نیز عدم ایجاد هزینه و مراحل کاری اضافی به نظر می‌رسد که استفاده از این پروتکل برای بهینه‌سازی سریع واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز، روشی منطقی و به صرفه باشد. توصیه می‌گردد در حالت برخورد با باندهای ناخواسته‌ای که با روش‌های معمول بهینه‌سازی حذف نمی‌شوند، استفاده از این پروسه قادر به رفع مشکل و حذف باندها از یک مسیر سریع و با صرفه خواهد بود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و همچنین کمیته تحقیقات دانشجویی که در انجام پژوهش حمایت مالی و معنوی نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

1-RT-PCR

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of Touchdown Nested PCR to Circumvent Spurious Priming and Increase Specificity during HIV and GBV-C Gene Amplification

Falahi SH*,
Ravanshad M,**
Kenarkohi O*,
Ghanbari R*,
Haji Abdolbaghi M*.**

*MSc in Virology, Department of Virology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
** Assistant Professor of Virology, Department of Virology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
*** Professor of Infectious Disease Division, Department of Infectious Disease Division, Emam Khomaini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received:08/12/2009
Accepted:03/01/2010

Corresponding Author: Ravanshad M
Email: Ravanshad@modares.ac.ir

ABSTRACT:

Introduction & Objective: Primer-Template hybridization temperature is one of the important parameters in Nested PCR optimization. Unlike instant temperature for sequence amplification in routine PCR process, Touchdown PCR is a modified form of standard PCR that employs a range of annealing temperature. This study intended to develop a Touchdown Nested PCR in order to circumvent spurious priming and enhancing specify during gene amplification.

Materials & Methods: This is an experimental study conducted at Tarbiat Modarres University of Tehran during 2008-2009**.** Study samples were collected from Digestive Diseases Research Centre-at Shari'ati Hospital and HIV research center – Imam Khomeini Hospital. After extracting the nucleic acid, primer designing for HIV and GBV-C and c-DNA synthesis; Nested PCR was performed on negative and positive samples using standard and touchdown protocols.

Results: The intended band was observed in all positive samples. No band was observed in any human and viral negative control samples. After electrophoresis of PCR products, non specific band were seen in HIV and GBV-C samples during standard PCR. Using the touchdown protocol, undesirable bands were omitted or significantly decreased.

Conclusion: In the present study, despite the formation of uncalled bands in standard reaction; using the touchdown method led to omission of non-specific bands without any significant effect on the final products. As for its simplicity, cost and time saving, it seems that using this method is a rational and economical way for fast optimization of PCR reactions.

Keywords: Touchdown Nested PCR, spurious priming, specificity, gene amplification

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES:

1.Bhat HK, Epelboym I. Quantitative analysis of total mitochondrial DNA: competitive polymerase chain reaction versus real-time polymerase chain reaction. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 2004;18(4): 180–6.
2.Imagawa DT, Lee MH, Wolinsky SM, Sano K, Morales F, Kwok S, et al. Human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods. New England Journal of Medical Science 1989; 320: 1458–62.
3.Gaspar JO, Belintani P, Almeida AMR, Kitajima EW. A degenerate primer allows amplification of part of the 3 -terminus of three distinct carlavirus species. Journal of Virological Methods 2008; 148: 283–5.
4.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.
5. 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(2): S381-6.
6. 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.
7.Llop P, Bonaterra A, Penalver J, Lopez 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 2002; 66:2071-8.
8. Hamburger JXY, Ramzy RM, Jourdane J, Ruppel A. Development and laboratory evaluation of a polymerase chain reaction for monitoring Schistosoma mansoni infestation of water. Am J Trop Med Hyg 1998; 59:468–73.
9.Hamburger J, Ramzy RM, Jourdane J, Ruppel A. Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of Schistosoma haematobium: a potential tool for monitoring schistosomeinfested water. Am J Trop Med Hyg 2001; 65: 907–11.
10.Meng Q, Rangachari A, Tamatsukuri M, Fliss E, Cheng L, Fiss E, et al. Automated multiplex assay system for simultaneous detection of Hepatitis B virus, Hepatitis C virus RNA and Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA. Journal of Clinical Microbiology 2001; 39(8):2937-45.
11.Coutllee F, Bobo L, Mayur K, Yolken R, Viscidi R. Enzyme immuno assay for detection of hybrides between PCR amplified HIV-1 DNA and RNA probe: PCR-ELA. AIDS Res Hum Retroviruses 1990; 6(6):775-84.
12.Albert JFE. Simple sensitive, and specific detection of Human Immunodeficiency Virus type 1 in clinical specimen by polymerase chain reaction with PCR. Journal of Clinical Microbiology 1990; 28(7): 1560-4.
13.Schmunis GA, Pinheiro F, Brandling-Bennett D. Risk of transfusion-transmitted infectious diseases in central and south America. Emerg Infect Dis 1998; 4(1): 5-11.
14.McPherson MJ, Moller S, Graham A. PCR; The Basics Bios, Scientific Publishers Ltd 2000; 2: 15.
15.Ziaeean M, Sabahi F, Alborzi A, Mahboodi F, Karimi M, Tahvildari PB. Development of a sensitive quantitative competitive PCR assay for detection of human cytomegalovirus DNA. Iranian Biomedical Journal 2005;9(4):187-91.
16.Cindy Christopherson JS. The effects of internal primer–template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies. Nucleic Acids Research 1997; 25: 654–8.
17.Don HR, Cox TP, Wainwright JB, Baker K, Mattick SJ. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res 1991; 19(14): 4008.
18.Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. Nat Protoc 2008; 3(9): 52-6.
19.De la Horra C, Varela JM, Friaza V, Respaldiza N, Muñoz-Lobato F, Montes-Cano MA, et al. Comparison of single and touchdown PCR protocols for detecting Pneumocystis jirovecii DNA in paraffin-embedded lung tissue samples. J Eukaryot Microbiol 2006; 53(1): S98-9.
20.Suzuki T, Osada Y, Kumagai T, Hamada A, Okuzawa E, Kanazawa. Early detection of Schistosoma mansoni infection by touchdown PCR in a mouse model. Parasitol Int 2006; 55(3): 213-8.
21.Huang XQ, Cloutier S. Hemi-nested touchdown PCR combined with primer-template mismatch PCR for rapid isolation and sequencing of low molecular weight glutenin subunit gene family from a hexaploid wheat BAC library. BMC Genet 2007; 8:18.

Archive of SID

www.SID.ir

22.Coyle PV, Ong GM, Neill HJO, McCaughey C, Ornellas DD, Mitchell F. A touchdown nucleic acid amplification protocol as an alternative to culture backup for immunofluorescence in the routine diagnosis of acute viral respiratory tract infections. BMC Microbiology 2004; 4:41.
23.Asagi TIS, Kaneda T, Suzuki H, Tezuka F, Nishimura H. RT-nested touchdown PCR is an effective method for gene amplification in genotypic analysis of drug-resistant HIV-1. Int Conf AIDS. 2002; 7-12; 14.
24.Woźniakowski G, Kozdruń W, Samorek-Salamonowicz E, Król K. Touchdown PCR for the Detection of Waterfowl Parvoviruses. Bull Vet Inst Pulawy 2009; 53: 3-7.
25.Cloutier X. Hemi-nested touchdown PCR combined with primer-template mismatch PCR for rapid isolation and sequencing of low molecular weight glutenin subunit gene family from a hexaploid wheat BAC library. BMC Genetics 2007; 8(18).
26.Helmy MM. Touchdown PCR, ELISA and stool examination for early diagnosing of Schistosoma mansoni in mice. J Egypt Soc Parasitol 2007; 37(3): 903-13.

Archive of SID

www.SID.ir