خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۸ شماره ۱ بهار ۹۰ (۵۱-۴۲)

مقاله پژوهشی

توسعه روش NASBA-ELISA برای تشخیص HIV-1 RNA

مریم شهرابی[۱]، مهدی فروزنده[۲]، فرزانه صباحی[۳]، مهدی پریان[۴]

چکیده

سابقه و هدف

با شروع عفونت HIV-1 ، اولین مارکری که در خون آشکار می‌شود، RNA ویروسی می‌باشد. از میان روش‌های موجود که شناسایی RNA را هدف قرار می‌دهند؛ متداول‌ترین روش‌ها NASBA و RT-PCR هستند. NASBA مزیت‌های متعددی نسبت به RT-PCR ارایه می‌کند. در این پژوهش، واکنش NASBA در ترکیب با روش آشکارسازی آسان و حساس الایزا، برای تشخیص و آشکارسازی HIV-1 RNA مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه انجام شده از نوع بنیادی ـ کاربردی بود. با وارد کردن نوکلئوتید 11-dig-UTP در مخلوط واکنش NASBA، RNA نشاندار تولید شد. آن‌گاه محصولات نشاندار NASBA در فاز مایع به یک پروب اختصاصی متصل به بیوتین هیبرید شدند. سپس هیبریدهای حاصل به یک پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین منتقل شده، پس از اعمال شستشوها و خارج کردن محصولات غیر اختصاصی از محیط واکنش، آشکارسازی نهایی با اضافه کردن کونژوگه آنتی دیگوکسی ژنین ـ آنزیم و سوبسترای آن صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده نشانگر کارآیی واکنش NASBA در تکثیر ناحیه مورد نظر از ژنوم ویروس بود و آشکارسازی محصولات NASBA بر روی ژل آگاروز منحصراً یک باند ۱۷۶ نوکلئوتیدی مربوط به هدف را نشان می‌داد. با به کارگیری روش الایزا در آشکارسازی محصولات NASBA ، برای غلظت ۰/۰۱ مایکرو مولار پروب، OD برابر با ۰/۱۱ ± ۱/۰۴۹ به دست آمد.

نتیجه گیری

در این مطالعه با به کارگیری آغازگر و پروب مناسب، روش تشخیصی NASBA-ELISA با حساسیت و اختصاصیت بالا برای HIV-1 راه‌اندازی شد.

کلمات کلیدی: NASBA ، الایزا، ایمونواسی، HIV-1

تاریخ دریافت : ۸۸/۹/۲۸
تاریخ پذیرش : ۸۹/۹/۲۵

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD بیوشیمی بالینی ـ دانشیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس ـ تهران ـ صندوق پستی: ۳۳۱-۱۴۱۱۵
۳ـ PhD میکروب شناسی ـ دانشیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی ـ دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

Archive of SID
www.SID.ir

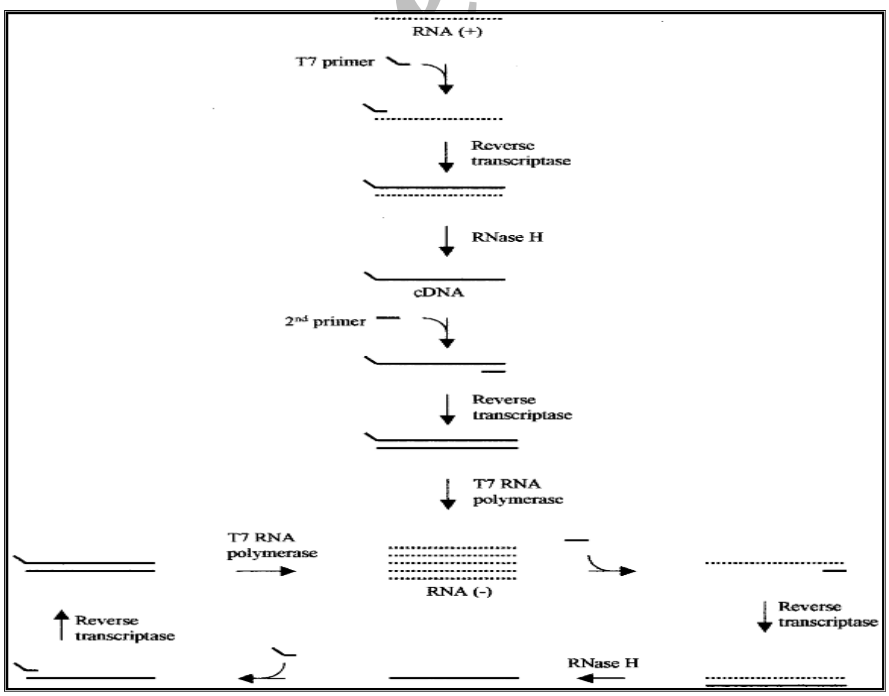
مقدمه

طی دو دهه اخیر، روش‌های تشخیص ویروس HIV-1 نقش بسیار مهمی را در حفظ سلامت در سراسر جهان ایفا کرده‌اند(۱). امروزه، روش‌های تشخیصی استاندارد HIV-1 به طور متداول مبتنی بر آنزیم ـ ایمونواسی و وسترن بلات می‌باشند؛ که در هر دو مورد به دلیل طولانی بودن دوره قبل از تغییرات سرمی، احتمال عدم تشخیص به موقع عفونت وجود دارد(۲).

اما اخیراً با گسترش روش‌های دقیق با حساسیت بالا، که بر اساس اصول بیولوژی مولکولی استوار می‌باشند؛ امکان تشخیص عفونت در مراحل اولیه نیز وجود دارد(۱). روش‌های مولکولی برای تشخیص HIV-1 در موارد زیر توصیه می‌شود:

۱- تشخیص عفونت در افرادی که به تازگی آلوده شده‌اند(۲). نوزادانی که از مادران آلوده متولد شده‌اند(۳). افراد با نتایج آزمایش‌های سرمی مبهم(۲).

اما بسیاری از تکنولوژی‌های در حال ظهور، به دلایل اقتصادی، در کشورهای فقیر و در حال توسعه که موضوع اصلی بحران ایدز در جهان هستند؛ قابل استفاده نمی‌باشند. امروزه روش‌های بسیاری برای تشخیص مولکولی بیماری‌های عفونی پیشنهاد می‌شوند؛ یکی از مهم‌ترین این روش‌ها، روش RT-PCR می‌باشد که برای اجرا به ابزارها و تجهیزات گران قیمتی نظیر ترمال سایکلر نیاز دارد. NASBA (Neucleic Acid Sequence Based Amplification) نیز یک واکنش تکثیر اسید نوکلئیک در شرایط تک دما می‌باشد، که از دو آغازگر اولیگو نوکلئوتیدی(یکی از آغازگرها حامل توالی پروموتری T7 می‌باشد) و سه آنزیم؛ رونوشت‌بردار معکوس، RNase H و T7 RNA پلیمراز استفاده می‌نماید(شکل ۱)(۶-۳). NASBA قادر به تکثیر هر دو مولکول RNA و DNA به عنوان الگو می‌باشد و محصول اصلی تکثیر در این واکنش، مولکول RNA است که با RNA الگو مکمل است(۷).



شکل ۱: مکانیسم عمل NASBA : با عمل آنزیم رونویسی‌کننده معکوس و در حضور آغازگر حامل توالی پروموتری T7 ، یک رشته cDNA ساخته می‌شود. هیبرید DNA/RNA ساخته شده توسط آنزیم RNaseH مورد تجزیه قرار گرفته و یک ملکول DNA تک رشته باقی می‌ماند. سپس آغازگر دوم که حاوی توالی مکمل cDNA می‌باشد به مولکول cDNA متصل می‌شود؛ با عمل پلیمرازی آنزیم رونویسی‌کننده معکوس یک مولکول cDNA دو رشته‌ای ساخته می‌شود. سپس آنزیم T7 RNA پلیمراز با الگو قرار دادن این مولکول cDNA کپی‌های متعددی از RNA را می‌سازد. محصولات تک رشته‌ای حاصل از واکنش می‌توانند بدون نیاز به دناتوراسیون وارد مرحله هیبریداسیون شوند(۸).

www.SID.ir

مطالعه‌های مختلف اثبات کرده است که NASBA یک روش مناسب برای تشخیص اسیدهای نوکلئیک ویروسی در نمونه‌های بالینی و پاتوژن‌های میکروبی در مواد غذایی و نمونه‌های محیطی می‌باشد(۱۶-۹). از مزیت‌های NASBA نسبت به RT-PCR می‌توان از عدم نیاز به دستگاه ترمال سایکلر و نیز عدم نیاز به بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگرها، به علت تک دما بودن واکنش نام برد(۱۷).

امروزه به منظور افزایش اختصاصیت روش‌های تشخیص مولکولی، در مرحله شناسایی، از یک هیبریداسیون اختصاصی با کاوشگرهای اولیگونوکلئوتید استفاده می‌شود. واکنش الایزا(ELISA) یکی از روش‌های آشکارسازی بر مبنای هیبریداسیون است. محصولات تکثیر نشاندار شده با مولکول دیگوکسی ژنین(dig)، با کاوشگرهای اختصاصی متصل به بیوتین هیبرید شده، به سطح پلیت پوشیده شده با استرپتاویدین متصل می‌شوند. هیبریدهای نشاندار شده با دیگوکسی ژنین، به آنتی‌بادی‌های آنتی ـ dig ، کونژوگه شده به آنزیم پراکسیداز یا آلکالین فسفاتاز متصل گشته و در حضور سوبسترای این آنزیم، واکنش رنگ سنجی اتفاق می‌افتد(۱۸). از مزیت‌های این روش استفاده از ابزارهای استاندارد و متداول و نیز مواد تجاری در دسترس می‌باشد(۱۹).

در این پژوهش یک روش تشخیص مبتنی بر NASBA-ELISA برای تکثیر و آشکارسازی توالی هدف از ژنوم ویروس HIV-1 راه‌اندازی شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه کاربردی، ابتدا کلیه توالی‌های گزارش شده برای HIV-1 در بانک اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) جمع‌آوری و توسط نرم‌افزار مگا ۳/۱ مورد هم ردیفی قرار گرفت و یک منطقه حفاظت شده بر روی ناحیه POL از ژنوم ویروس، برای طراحی آغازگر و پروب انتخاب گردید(شکل ۲). سپس با استفاده از نرم‌افزار طراحی آغازگر الیگو-۶، آغازگرها و پروب مناسب برای تکثیر و شناسایی ناحیه هدف از ژنوم ویروس طراحی شدند(جدول ۱).

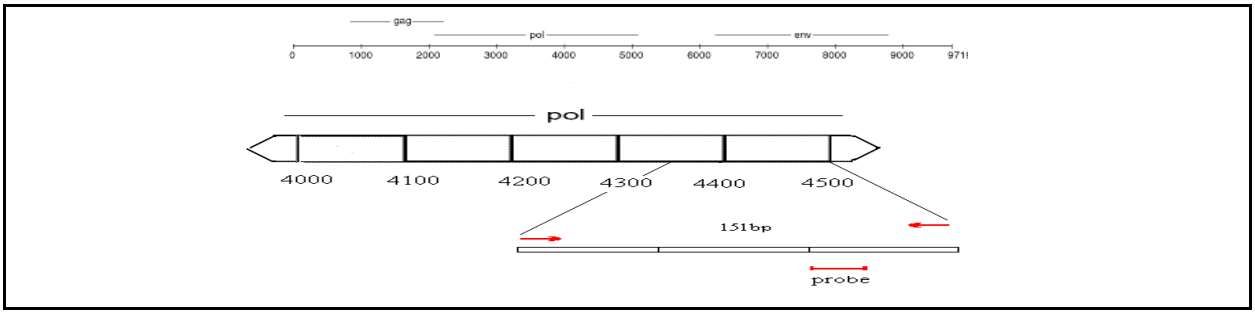
جدول ۱: توالی‌های آغازگر و پروب طراحی شده برای واکنش NASBA-ELISA

آغازگر/پروب	توالی('3→'5)	جایگاه
HIF[a]	5′ GTA CAG TGC AGG GGA AAG 3′	۴۳۵۴-۴۳۷۱
HIR[b]	5′ AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAA AAC CAG AGI AG(C/T) TTT GCT G 3′	۴۴۸۸-۴۵۰۴
MSF[c]	5′ TTT ATT ACA GGG ACA GCA GA 3′	۴۴۴۹-۴۴۶۸

a : آغازگر پیشرو

b : آغازگر معکوس، به انتهای '5 آغازگر معکوس، یک توالی پروموتری T7 متصل است. توالی پروموتری با خط کشی مشخص شده است.

پc : پروب اختصاصی، در انتهای '5 به یک مولکول بیوتین متصل است(به منظور استفاده در الایزا).



شکل ۲: موقعیت شماتیکی جایگاه آغازگرها، پروب بر روی ژنوم

Archive of SID
www.SID.ir

ساخت RNA درآزمایشگاه (In vitro transcription):

ابتدا RNA ژنومی ویروس توسط کیت تخلیص RNA (شرکت رُوش، آلمان)، مورد استخراج قرار گرفت؛ سپس طی یک واکنش RT-PCR ، با استفاده از آغازگرهای HIF و HIR ژنوم ویروس مورد تکثیر و محصولات حاصل از تکثیر، در وکتور PTZ57R/T فرمنتاز حاوی ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین به روش T.A کلونینگ شد. پلاسمیدهای نوترکیب در سلول‌های باکتریایی *E.coli* سویه DH5α به روش ترانس فورماسیون وارد شدند و در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین مورد تکثیر قرار گرفتند. به منظور تایید کلونینگ، واکنش PCR بر روی هر یک از کلون‌های رشد کرده بر روی محیط کشت آنتی‌بیوتیک‌دار، انجام شد.

برای استخراج پلاسمیدهای نوترکیب از سلول‌های باکتریایی، کلونی‌های ترانس فرم شده در محیط LB مایع کشت داده شدند؛ سپس طبق دستورالعمل کیت تخلیص پلاسمید(شرکت MN، آلمان)، DNA پلاسمیدی استخراج شد. در نهایت پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده، توالی‌یابی شدند و صحت کلونینگ مورد تایید قرار گرفت.

به منظور تولید مولکول‌های RNA با اندازه یکسان در فرآیند ساخت RNA، به یک مولکول DNA خطی، به عنوان الگو نیاز می‌باشد. به این منظور بر روی پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه مورد نظر، واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (حامل پروموتر T7) صورت گرفت. محصول PCR که یک مولکول DNA خطی حامل توالی پروموتر T7 می‌باشد؛ به عنوان الگو در فرآیند ساخت RNA مورد استفاده قرار گرفت؛ سپس طبق دستورالعمل کیت ساخت RNA در آزمایشگاه (فرمنتاز، آلمان) و با استفاده از خاصیت آنزیم T7 RNA پلیمراز در رونویسی از الگوهای دارای پروموتر T7، ساخت RNA HIV-1 در آزمایشگاه، صورت گرفت. RNA ساخته شده پس از تیمار توسط DNase I (به منظور حذف پلاسمید)، طی فرآیند تخلیص RNA مورد خالص‌سازی قرار گرفت و در دمای ۸۰°C- ذخیره شد؛ تا در نهایت به عنوان الگو در واکنش NASBA مورد استفاده قرار گیرد.

واکنش NASBA:

واکنش NASBA که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، مانندآن چه در مطالعه‌های پیشین انجام شده بود، با اندکی تغییرات تنظیم شد(۵). واکنش در حجم نهایی ۲۵ مایکرولیتر محلول شامل: محلول ۴۰ میلی مولار تریس ـ هیدرو کلراید با pH برابر با ۸/۵ (فرمنتاز، آلمان)، منیزیم کلراید ۴ میلی مولار(فرمنتاز، آلمان)، کلرید پتاسیم ۵۰ میلی مولار(فرمنتاز، آلمان)، دی متیل سولفوکساید با نسبت حجمی ۵٪ (فرمنتاز، آلمان)، ۰/۴ میلی‌مولار از هر یک از دزوکسی نوکلئوتیدهای -۳- فسفاته(فرمنتاز، آلمان)، محلول‌های ۰/۸ میلی مولار از آدنوزین تری فسفات، گوانوزین تری فسفات، تیمیدین تری فسفات(فرمنتاز، آلمان)، ۰/۲۸ میلی‌مولار دیگوکسی ژنین -۱۱- یوریدین تری فسفات (رُوش، آلمان)، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۸ واحد آنزیم M-MuLV (Moloney Murine Leukemia Virus) ترانس کریپتاز معکوس (فرمنتاز، آلمان)، ۰/۰۸ واحد آنزیم RNaseH (فرمنتاز، آلمان)، ۲۰ واحد T7 RNA پلیمراز(فرمنتاز، آلمان)، ۱۲ واحد مهارکننده RNase (فرمنتاز، آلمان) و ۱ مایکروگرم از RNA الگو انجام شد. کلیه مواد در غلظت‌های ذکر شده، به جز آنزیم‌ها وارد مخلوط واکنش شدند. به منظور باز کردن (دناتوراسیون) ساختارهای ثانویه RNA، ۵ دقیقه گرماگذاری در دمای ۶۵ ºC صورت گرفت؛ هم چنین برای اتصال آغازگرها، ۵ دقیقه در ۴۱ ºC گرماگذاری شد. پس از اضافه کردن آنزیم‌ها به مخلوط واکنش، در دمای ۴۱ ºC به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شد.

آشکارسازی محصولات NASBA به روش الایزا:

ابتدا به منظور به دست آوردن غلظت بهینه پروب در واکنش الایزا، رقت‌های مختلفی از پروب(در بافر هیبریداسیون)(رُوش، آلمان)، تهیه شد. محصولات NASBA نشاندار شده با مولکول دیگوکسی ژنین نیز، ۵ دقیقه در دمای ۶۵ ºC قرار داده شدند؛ تا ساختارهای ثانویه موجود بر روی RNA ناپایدار گردد. سپس RNA های خطی شده به ۱۰۰ مایکرولیتر محلول پروب تهیه شده در مرحله قبل اضافه گردید. مخلوط پروب و محصول

Archive of SID
www.SID.ir

NASBA بـه یـک میکروپلیـت پوشـیده بـا اسـترپتواویدین (شرکت نانک، دانمارک)، منتقـل گردیـد و در یـک شـیکر میکروپلیت به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۷ ºC گرماگـذاری شـد؛ سپس پلیت‌ها ۳ مرتبه توسط بـافر شستـشو(رُوش، آلمـان) مورد شستشو قرار گرفتند. در مرحله بعـد ۱۰۰ مـایکرولیتر از کونژوگه آنتی‌دیگوکسی ژنین ـ پراکـسیداز، کـه قـبلاً در بافر مخصوص کونژوگه(رُوش، آلمان) به نسبت ۱ بـه ۱۰۰ رقیق شده بود، به هریک از چاهک‌های میکروپلیت اضـافه شـد و مجـدداً بـه مـدت ۳۰ دقیقـه در دمـای ۳۷ ºC قـرار گرفت. مجـدداً پـس از ۳ بـار شستـشو ۱۰۰ مـایکرولیتر از سوبسترای آنزیم پراکسیداز(ABTS) [۲ و ۲'- ازینـو- دی- (۳- اتیل بنز تیازولین-۶- سولفولیک اسید)](رُوش، آلمان) به هر چاهک اضافه شـد و بـه مـدت ۳۰ دقیقـه در ۳۷ ºC گرماگذاری شد. در نهایت میزان رنگ تولیـد شـده در اثـر واکنش آنزیم- سوبسترا در طول موج ۴۰۵ نانومتر در یـک دستگاه قرائت‌گر الایزا مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

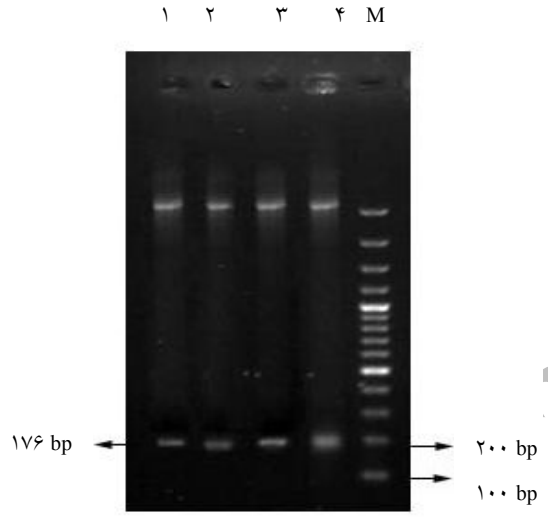
انجام واکنش NASBA بر روی نمونه سرمی بیمار:

به منظـور تاییـد توانـایی واکـنش NASBA-ELISA در تشخیص RNA ویروسـی در پلاسـما، آزمـایش NASBA-ELISA بر روی نمونه RNA اسـتخراج شـده از سـرم فـرد آلوده به ویروس(تاییـد شـده بـه وسـیله آزمـایش الایـزا و وسترن بلات) صورت گرفت.

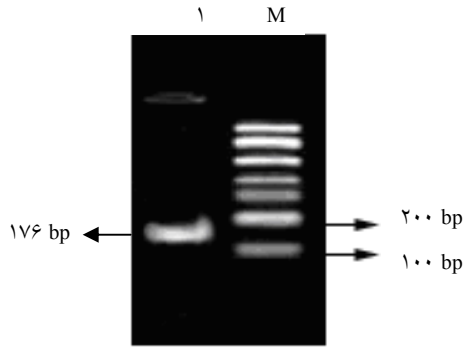
یافته‌ها

کلونینگ و ساخت RNA در آزمایشگاه :

ناحیـه مـورد نظـر از ژنـوم ویـروس توسـط آغازگرهـای اختصاصی طی واکنش PCR تکثیر و جداسازی شد. سـپس محـصول PCR طـی پروسـه T.A کلونینـگ بـه وکتـور PTZ57R/T (حاوی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سـیلین) وارد و وکتور نوترکیب به درون باکتری *E.coli* انتقال یافت. کلـون‌هـای باکتریـایی بـا رشـد بـر روی محـیط حـاوی آنتـی‌بیوتیـک آمپـی‌سـیلین و انجـام واکـنش کلـونی PCR غربالگری شدند(شـکل ۳). پـس از اسـتخراج پلاسـمید و توالی یابی، بـه منظـور تولیـد الگـوی DNA خطـی، بـرای شرکت در واکنش سـاخت RNA ، واکـنش PCR بـر روی DNA پلاسمیدی حاوی توالی ژنومی ویروس با اسـتفاده از آغازگرهای حامل پرومـوتر T7 انجـام شـد. سـایر مراحـل سـاخت RNA، طبـق دسـتورالعمل سـاخت RNA در آزمایشگاه صورت گرفـت(شـکل۴). بـه ایـن ترتیـب یـک وکتور بیانی نوترکیب دارای توالی ژنـومی ویـروس HIV-1 ساخته شد.



سحل ۱: تایید کلونینگ با استفاده از واکنش کلونی PCR : ستون ۱، ۲ ، ۳ و ۴ نتیجه PCR بر روی کلون‌های مختلـف بـر روی محـیط کشت آگار حاوی آمپی‌سیلین و M(مارکر مولکولی). بانـد bp ۱۷۶ مربوط به قطعه اختصاصی تکثیـر شـده، نـشان‌دهنـده ورود موفـق وکتور نوترکیب به کلون‌های انتخاب شده می‌باشد. باند اضـافی در بالای تصویر نیز ناشی از غلظت بالای پلاسـمید مـی‌باشـد کـه در الکتروفورز مشاهده می‌شـود و تـاثیری در تفـسیر نتیجـه مثبـت از واکنش کلونی PCR ندارد.



شکل ۴: ارزیابی کیفیت RNA ساخته شـده، توسـط الکتروفـورز: ستون ۱ RNA ساخته شده بـه روش *In vitro* transcription و M ، مارکر مولکولی RNA است. باند ۱۷۶ نوکلئوتیدی، سـنتز RNA بـا طول یکنواخت و یکسان را با کیفیت بالا نشان می‌دهد.

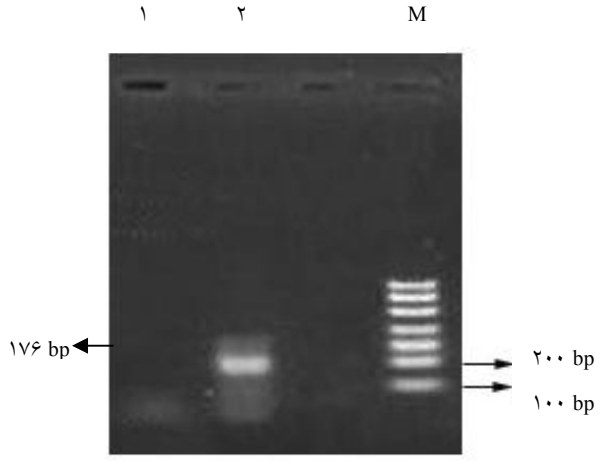
Archive of SID
www.SID.ir

ارزیابی اختصاصیت آغازگر و کارآیی واکنش NASBA در تکثیر ناحیه هدف از ژنوم ویروس:

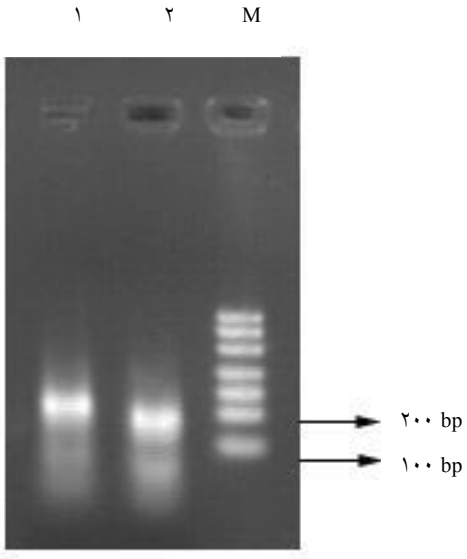
ارزیابی محصولات NASBA با ژل الکتروفورز، یک باند اختصاصی ۱۷۶ نوکلئوتیدی را نشان داد(شکل ۵). در ستون کنترل منفی نیز هیچ‌گونه تکثیری مشاهده نشد. نتایج، موفقیت واکنش NASBA را در تکثیر ناحیه هدف از ژنوم اثبات کرد.

بررسی اثر نوکلئوتید تغییر یافته dig-UTP بر واکنش NASBA:

به منظور بررسی اثر نوکلئوتید تغییر یافته dig-UTP، محصولات NASBA نشاندار و غیر نشاندار هر دو به وسیله ژل الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد به کارگیری dig-UTP هیچ گونه تاثیر منفی در واکنش NASBA نخواهد داشت؛ با این تفاوت که ورود مولکول‌های دیگوکسی ژنین در ساختار محصول NASBA، از طریق افزایش وزن مولکولی، تنها حرکت الکتروفورتیک آن را محدودتر کرده است(شکل ۶). با توجه به این که محصولات NASBA از جنس RNA می‌باشند و به علت ناپایدار بودن RNA، وجود اسمیر در کنار باند اختصاصی توجیه‌پذیر است، اما تاثیر منفی در تفسیر نتیجه واکنش نخواهد داشت.



شکل۵: ارزیابی اختصاصیت آغازگر و کارآیی واکنش NASBA با استفاده از ژل الکتروفورز: در ستون ۱ کنترل منفی، ستون ۲ باند ۱۷۶ نوکلئوتیدی مربوط به واکنش NASBA و ستون M، مارکر مولکولی باند اختصاصی ۱۷۶ نوکلئوتیدی به خوبی ملاحظه می‌شود.



شکل ۶: آنالیز و مقایسه محصولات NASBA نشاندار و غیر نشاندار: ستون ۱ محصول NASBA نشاندار، ستون ۲ محصول NASBA غیر نشاندار و ستون M مارکر مولکولی. ورود dig موجب افزایش وزن مولکولی محصولات گردیده است(ستون۱) ولی تاثیری در کارآیی واکنش NASBA نداشته است.

آشکارسازی RNA ساخته شده به روش NASBA-ELISA و محصولات NASBA نشاندار شده با مولکول دیگوکسی ژنین، پس از هیبریداسیون و اتصال به پروب‌های اختصاصی (متصل به بیوتین) به یک فاز جامد منتقل شدند. فاز جامد حاوی مولکول‌های استرپتو اویدین می‌باشد؛ از طریق اتصال بیوتین - استرپتواویدین، هیبریدهای پروب - RNA به سطح جامد متصل شد. با افزودن آنتی‌بادی اختصاصی مولکول دیگوکسی ژنین به محیط، که به یک آنزیم پراکسیداز متصل است و نیز افزودن سوبسترای آنزیم(ABTS)، یک واکنش رنگ سنجی که نشان از صحت واکنش NASBA بود؛ اتفاق افتاد(جدول ۲).

انجام واکنش NASBA بر روی نمونه سرمی آالوده به ویروس HIV-1:

این آزمایش بر روی نمونه بیمار انجام و نتیجه مثبت شد. ظهور رنگ سبز نشان دهنده مثبت بودن واکنش می‌باشد؛ که در صورت نیاز می‌توان با استفاده از دستگاه قرائت‌گر الایزا(ELISA Reader) مقدار آن را نیز سنجید.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۲: نتایج واکنش NASBA-ELISA در غلظت‌های مختلف پروب

غلظت پروب (µM)	OD[1] ± SD[2]
۱	۰/۲۱۷ ± ۰/۱۱
۰/۲	۰/۶۲۵ ± ۰/۱۱
۰/۰۱	۱/۰۴۹ ± ۰/۱۱
NSB	۰/۱ ± ۰/۱۱

۱: Optical Density ، جذب نور(در nm ۴۵۰)
۲: انحراف معیار

بحث

اولین نکته حایز اهمیت در تحقیقات مرتبط با بیماری‌های عفونی، ایمنی کار در آزمایشگاه و نیز محدودیت در دست‌یابی به نمونه‌های بیماران می‌باشد. لذا در این پژوهش در اولین قدم، کلونی از HIV-1 ، به عنوان یک سازه پایدار ژنی بیان کننده RNA ویروسی، ساخته شد. چنین سازه‌ای در تحقیقات مرتبط با HIV-1 کارآیی فراوانی خواهد داشت. در این پژوهش نیز به منظور افزایش ایمنی زیستی، با استفاده از فرآیند سنتز RNA در آزمایشگاه، مقادیر زیادی RNA مشابه با RNA ویروسی ساخته شد و راه‌اندازی روش NASBA-ELISA برای شناسایی HIV-1 RNA، با استفاده از آغازگرها و پروب طراحی شده، بر روی این RNA صورت گرفت.

در مطالعه‌های گذشته، کاربرد NASBA به عنوان یک روش جایگزین برای RT-PCR در تشخیص و آشکارسازی ویروس‌های RNA دار اثبات شده است. NASBA در مقایسه با RT-PCR مزیت‌های متعددی را ارایه می‌کند. واکنش NASBA طی یک مرحله و یک دما انجام می‌شود؛ در حالی که واکنش RT-PCR طی دو مرحله و در یک سیکل دمایی پیچیده صورت می‌گیرد و به تجهیزات پیچیده‌ای نظیر ترمال سایکلر نیازمند است. NASBA از نظر اصول و تئوری، توانایی تکثیر بالاتری را نسبت به RT-PCR ارایه می‌دهد؛ هر مولکول cDNA که در هر چرخه NASBA تولید می‌شود؛ بارها توسط آنزیم T7 RNA پلیمراز مورد رونویسی قرار می‌گیرد و کپی‌های متعددی از RNA از آن ساخته می‌شود؛ اما در RT-PCR، هر مولکول cDNA در هر چرخه واکنش، تنها دو برابر می‌شود(۵)؛ این مساله زمان انکوباسیون NASBA را نسبت به RT-PCR کوتاه‌تر می‌سازد. در یک واکنش NASBA بعد از دناتوراسیون RNA هدف، هیبریداسیون آغازگر پیشرو به مولکول هدف و افزودن آنزیم‌ها، واکنش طی ۲-۱ ساعت در ºC ۴۱ به طور خودکار تکمیل می‌شود؛ سرعت واکنش به عواملی نظیر کارآیی اتصال آغازگرها که به توالی و ساختار RNA الگو وابسته است و نیز میزان ساخت محصولات غیر اختصاصی بستگی دارد(۴).

با این وجود معایبی نیز برای واکنش NASBA شمرده می‌شود: از جمله این که احتمال وقوع واکنش‌های غیر اختصاصی در NASBA ، وجود دارد؛ به این دلیل که دمای واکنش نمی‌تواند بدون خطر دناتوراسیون آنزیمی به بالاتر از ºC ۴۱ افزایش یابد(۲۰).

بنابراین روشی که برای آشکارسازی و تجزیه محصولات NASBA انتخاب می‌شود؛ از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

الکتروفورز به روش اتیدیوم بروماید، در انتهای واکنش NASBA یک روش متداول برای تایید یک تکثیر موفق و هدفمند است. الکتروفورز یک روش ارزان است که به تجهیزات خاصی نیاز ندارد، در زمان نسبتاً کوتاهی انجام می‌شود و در اغلب آزمایشگاه‌ها قابل اجرا است. اما برخلاف مزایای آن، در الکتروفورز ضمن استفاده از ترکیبات سرطان‌زا، امکان شناسایی و اثبات دقیق محصولات تکثیر وجود ندارد. الایزا روشی است با حساسیت بیشتر از الکتروفورز که امکان تجزیه تعداد زیادی نمونه را به صورت هم‌زمان، فراهم می‌آورد. در این روش سرعت دست‌یابی برای هر نمونه بسیار بالا(۵۰ ثانیه برای هر نمونه) است(۲۱). هم چنین تایید مثبت بودن یک واکنش از طریق الایزا صرفاً از طریق مشاهده صورت می‌گیرد و نیز فرمت آن امکان آنالیز هم زمان ۹۶ نمونه را در کنار هم فراهم می‌آورد(۲۱). اگرچه خطر آلودگی با محصولات تکثیر شده که می‌تواند به جواب‌های مثبت کاذب منتهی شود، در سیستم الایزا بیشتر از روش‌های جدیدی نظیر real-time می‌باشد، اما می‌توان این مساله را

Archive of SID
www.SID.ir

با جداسازی فضاهای کاری، استفاده از دستکش، استفاده از ابزارهای اختصاصی و دقت در انجام مراحل کار به حداقل رساند، هم چنین در این روش در مقایسه با real-time ، نیاز به استفاده از ابزارهای گران قیمت مرتفع شده و در عوض از ابزارهای پایه موجود در آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده می‌شود، علاوه بر این، واکنش الایزا حساسیتی مشابه با real-time را ارایه می‌دهد(۱۸).

در این پژوهش؛ NASBA به عنوان روش برتر برای تکثیر RNA انتخاب شد و با استفاده از دو آغازگر الیگونوکلئوتیدی HIR وHIF ، ناحیه ۱۷۶ نوکلئوتیدی از ژنوم ویروس تکثیر شد.

واکنش NASBA در یک مرحله، در دمای واحد ۴۱ ºC طی ۹۰ دقیقه انجام شد و آشکارسازی محصولات نیز با روش الایزا طی ۳ – ۲/۵ ساعت انجام گرفت؛ بنابراین زمان لازم برای انجام پروسه کامل NASBA-ELISA برابر با ۴/۵-۴ ساعت خواهد بود؛ که این زمان با توجه به قابلیت واکنش الایزا در انجام هم زمان تعداد زیادی واکنش، برای یک آزمایش تشخیصی مطلوب می‌باشد.

به منظور بهینه‌سازی واکنش الایزا، فراهم آوردن شرایط مناسب برای وقوع بیشترین میزان هیبریداسیون بین پروب و محصول NASBA ، از ضروریات روش می‌باشد. نتایج نشان داد که در غلظت ۰/۰۱ مایکرومولار پروب، بیشترین میزان هیبریداسیون و نیز بیشترین میزان سیگنال تولید می‌شود(جدول ۲). به منظور تایید کارآیی واکنش بر روی نمونه‌های بالینی و بررسی اثر عوامل ممانعت کننده احتمالی موجود در نمونه‌های بالینی بر واکنش NASBA ، واکنش بر روی نمونه بیمار آلوده به ویروس، تایید شده به عنوان آنتی‌بادی مثبت، انجام شد.

ترکیب واکنش تکثیری NASBA ، با قدرت و حساسیتی برابر و در مواردی بیشتر از PCR و روش آشکارسازی الایزا، با حساسیتی تا ۱۰۰ برابر بیشتر از ژل الکتروفورز، یک روش تشخیصی قدرتمند و حساس را ایجاد می‌نماید(۲۶-۲۲). توسعه روش، به منظور استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، نیازمند به بررسی‌های بیشتر بر روی نمونه‌های بالینی و آزمایشگاهی می‌باشد. در روش موجود، هم چنین با استفاده از یک منحنی استاندارد، قابلیت‌های لازم برای ارایه به عنوان یک روش کمی نیز وجود دارد. نتایج به دست آمده حاکی از کارآمد بودن سیستم پایه‌گذاری شده بر مبنای NASBA-ELISA ، برای تشخیص HIV-1 RNA می‌باشد.

نتیجه‌گیری

ترکیب روش تکثیری NASBA با روش آشکارسازی الایزا می‌تواند گامی رو به جلو در جهت توسعه روش‌های استاندارد و ارزان، برای تشخیص HIV-1 و سایر ویروس‌ها باشد. این روش قابلیت اختصاصیت بالا را(مربوط به آغازگرها و پروب اختصاصی) با حساسیت بالا(ناشی از تکثیر نمایی NASBA و قدرت آشکارسازی الایزا) تلفیق می‌کند(۲۷). بررسی‌های بیشتر به منظور استفاده از روش برای تشخیص عفونت در نمونه خون و نیز کمی سازی آن ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشکده علوم پزشکی تربیت مدرس انجام پذیرفته است. بدین‌وسیله از زحمات و راهنمایی‌های خانم ریحانه رمضانی و آقایان دکتر سعید عامل جامه‌دار و عباسعلی راز تشکر و قدردانی می‌شود.

References :

1- Constantine NT, Zink H. HIV testing technologies after two decades of evolution. Indian J Med Res 2005; 121(4): 519-38.
2- Newell ML. Current issues in the prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 infection. Trans R Soc Trop Med Hyg 2006; 100(1): 1-5.
3- Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. Nature 1991; 350(6313): 91-2.
4- Deiman B, van Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence - based amplification (NASBA). Mol Biotechnol 2002; 20(2): 163-79.
5- Jean J, Blais B, Darveau A, Fliss I. Detection of hepatitis A virus by the nucleic acid sequence-based amplification technique and comparison with reverse transcription-PCR. Appl Environ Microbiol 2001; 67(12): 5593-600.
6- Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, Schukkink R, Dircks M, Adriaanse H, *et al*. NASBA isothermal enzymatic *in vitro* nucleic acid amplification optimized

Archive of SID
www.SID.ir

for the diagnosis of HIV-1 infection. J Virol Methods 1991; 35(3): 273-86.
7- Rodríguez-Làzaro D, Lloyd J, Ikonomopoulos J, Pla M, Cook N. Unexpected detection of DNA by nucleic acid sequence-based amplification technique. Mol Cell Probes 2004; 18(4): 251-3.
8- Dinesh P, Ambarish SV. DNA based methods used for characterization and detection of food borne bacterial pathogens with special consideration to recent rapid methods. Afr J Biotechnol 2009; 8(9): 1768-75.
9- Loens K, Goossens H, de Laat C, Foolen H, Oudshoorn P, Pattyn S, *et al*. Detection of rhinoviruses by tissue culture and two independent amplification techniques, nucleic acid sequence-based amplification and reverse transcription-PCR, in children with acute respiratory infections during a winter season. J Clin Microbiol 2006; 44(1): 166-71.
10- Loens K, Beck T, Ursi D, Overdijk M, Sillekens P, Goossens H, *et al*. Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, and Legionella spp. in respiratory specimens. J Clin Microbiol 2008; 46(1): 185-91.
11- Yoo JH, Choi JH, Choi SM, Lee DG, Shin WS, Min WS, *et al*. Application of nucleic acid sequence-based amplification for diagnosis of and monitoring the clinical course of invasive aspergillosis in patients with hematologic diseases. Clin Infect Dis 2005; 40(3): 392-8.
12- Witt DJ, Kemper M, Stead A, Sillekens P, Ginocchio CC, Espy MJ, *et al*. Analytical performance and clinical utility of a nucleic acid sequence-based amplification assay for detection of cytomegalovirus infection. J Clin Microbiol 2000; 38(11): 3994-9.
13- Lanciotti RS, Kerst AJ. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. J Clin Microbiol 2001; 39(12): 4506-13.
14- Hibbitts S, Rahman A, John R, Westmoreland D, Fox JD. Development and evaluation of NucliSens basic kit NASBA for diagnosis of parainfluenza virus infection with 'end-point' and 'real-time' detection. J Virol Methods 2003; 108(2): 145-55.
15- Fykse EM, Skogan G, Davies W, Olsen JS, Blatny JM. Detection of Vibrio cholerae by real-time nucleic acid sequence-based amplification. Appl Environ Microbiol 2007; 73(5): 1457-66.
16- Cook N. The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. J Microbiol Methods 2003; 53(2): 165-74.
17- Saeedinia A, Shamsara M, Zeinoddini M, Sadeghi V, Maghsoudi N. Evaluation of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for detection of coxsackievirus B3 in cell culture and animal tissue samples. IJB 2008 ; 6(4): 222-28.
18- Musiani M, Venturoli S, Gallinella G, Zerbini M. Qualitative PCR-ELISA protocol for the detection and typing of viral genomes. Nat Protoc 2007; 2(10): 2502-10.
19- Gomes LI, Dos Santos Marques LH, Enk MJ, de Oliveira MC, Coelho PM, Rabello A. Development and evaluation of a sensitive PCR-ELISA system for detection of schistosoma infection in feces. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(4): e664.
20- Tai JH, Ewert MS, Belliot G, Glass RI, Monroe SS. Development of a rapid method using nucleic acid sequence-based amplification for the detection of astrovirus. J Virol Methods 2003; 110(2): 119-27.
21- Milne SA, Gallacher S, Cash P, Porter AJ. A reliable RT-PCR-ELISA method for the detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in farmed rainbow trout. J Virol Methods 2006; 132(1-2): 92-6.
22- Tetali S, Lee EM, Kaplan MH, Romano JW, Ginocchio CC. Chemokine receptor CCR5 Delta 32 genetic analysis using multiple specimen types and the NucliSens Basic Kit. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8(5): 965-71.
23- Birch L, Dawson CE, Cornett JH, Keer JT. A comparison of nucleic acid amplification techniques for the assessment of bacterial viability. Lett Appl Microbiol 2001; 33(4): 296-301.
24- Loeffler J, Hebart H, Cox P, Flues N, Schumacher U, Einsele H. Nucleic acid sequence-based amplification of Aspergillus RNA in blood samples. J Clin Microbiol 2001; 39(4): 1626-9.
25- Chansiri K, Khuchareontaworn S, Sarataphan N. PCR-ELISA for diagnosis of Trypanosoma evansi in animals and vector. Mol Cell Probes 2002; 16(3): 173-7.
26- Elandalloussi LM, Leite RM, Afonso R, Nunes PA, Robledo JA, Vasta GR, *et al*. Development of a PCR-ELISA assay for diagnosis of Perkinsus marinus and Perkinsus atlanticus infections in bivalve molluscs. Mol Cell Probes 2004; 18(2): 89-96.
27- Verheyden B, Lauwers S, Rombaut B. Quantitative RT-PCR ELISA to determine the amount and ratio of positive- and negative strand viral RNA synthesis and the effect of guanidine in poliovirus infected cells. J Pharm Biomed Anal 2003; 33(2): 303-8.

Archive of SID

www.SID.ir

Original Article

Development of NASBA-ELISA technique for detection of HIV-1 RNA

Shahrabi M.[1], Forouzandeh M.[1], Sabahi F.[2], Paryan M.[1]

[1]*Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
[2]*Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Viral RNA is the first blood marker which appears in HIV-1 infection. RT-PCR and NASBA are the commonly used techniques for amplification of RNA. NASBA technique provides more advantages over RT-PCR. In this study, an NASBA assay combined with an easy, sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for detection of HIV-1 RNA.

Materials and Methods

11-dig-UTP was added to an NASBA reaction mixture and the RNA amplicons were labeled. Then, the dig-labeled NASBA products hybridized to a biotinylated specific probe in hybridization solution buffer and the hybrids were transferred to a streptoavidin-coated plate. After several washing processes and emission of nonspecific products, the final detection of the captured RNA was done by addition of anti-dig antibody-enzyme conjugate and the substrate.

Results

The results demonstrated that, NASBA is an efficient method for amplification of the target genome. Detection of NASBA products by agarose gel electrophoresis showed a unique 176 bp band corresponding to the specific target. For the detection of NASBA products, an ELISA assay was performed; using 0.01 µM probe, the OD of 1.049 ± 0.11 was obtained.

Conclusions

In this study, by using suitable primers and probe a highly sensitive and specific NASBA-ELISA method for detection of HIV-1 developed.

Key words: Nasba, Elisa, Immunoassay, HIV-1
Sci J Iran Blood Transfus Org 2011; 8(1): 42-51

Received: 19 Nov 2009
Accepted: 16 Dec 2010

Correspondence: Forouzandeh M. PhD of Clinical Biochemistry. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University.
P.O.Box: 14115-331, Tehran, Iran. Tel: (+9821)82883861; Fax: (+9821) 82883861
E-mail: *foroz@modares.ac.ir*

Archive of SID
www.SID.ir