Arak Medical University Journal (AMUJ)
2011; 14(57): 60-68

Original Article

Application of new degenerate primer set for simultaneous isolation of hyper variable subunit of ENV gene from distinct HIV-1 genotypes

Falahi Sh[1], Ravanshad M[*1], Kenar-koohi A[1]

1- Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received 30 Nov 2009 , Accepted 13 January 2010

Abstract

***Introduction*:** Polymerase chain reaction is the most common technique in the field of molecular biology that use for amplification of a specific nucleic acid sequence. Degenerate primers have ability to amplify related but distinct sequences. The aim of current study was to use, two sets of degenerate primers in combination with Hemi Nested PCR for detection V3-Loop sequence of envelope gene from wide spectrum of Human Immunodeficiency Virus (HIV) subtypes.

***Material and Methods*:** In this experimental study we designed and optimized, a degenerate primer pair in combination with Hemi Nested PCR, to detect HIV-1 V3 loop from Envelop gene that has wide variations among genotypes. The developed assay was used to check, 40 HIV infected, 10 negative controls as well as 5 samples from each HCV, HBV, HGV, and TTV were analyzed using developed method.

***Results*:** after optimization, 35 out of 40 positive controls were positive using our test. None of the negative human and viral control samples showed specific band. Also, in positive samples, non-specific bands were not detected.

***Conclusion*:** In this study moreover than standard PCR, we used two degenerate primers that could detect specific region of genome. In fact, first round of PCR product act as a template for second round inner primers and can produce smaller sequence with high sensitivity due to degeneracy. Based on the current investigation, the developed assay had advantages including product confirmation and hence more sensitivity.

***Keywords*:** Degenerate Primers For Pcr, V3- Loop, Hiv, Rt-Pcr,

Corresponding author:
Address: Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: ravanshad@modares.ac.ir

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 14، شماره 4 (شماره پیاپی 57)، مهر و آبان 1390، 68-60

به کارگیری یک سری جدید پرایمرهای دژنره برای جدا سازی هم‌زمان ناحیه بسیار متغیر V3-Loop از ژنوتیپ‌های متفاوت HIV-1

شهاب فلاحی[1]، مهرداد روانشاد[2*]، عذرا کنارکوهی[3]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس شناسی پزشکی، گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

2- استادیار، گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

3- دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ایران

تاریخ دریافت:88/9/9، تاریخ پذیرش: 88/10/23

چکیده

زمینه و هدف: واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) رایج ترین تکنیک در عرصه زیست شناسی مولکولی است که برای تکثیر یک توالی اختصاصی اسید نوکلئیک به کار می‌رود. پرایمرهای دژنره دارای توانایی تکثیر توالی‌های وابسته اما متفاوت هستند. هدف مطالعه حاضر استفاده از دو جفت پرایمر دژنره در ترکیب با Hemi Nested PCR برای تشخیص ناحیه V3-Loop ژن پوشش طیف وسیعی از ساب تایپ‌های ویروس HIV-1 است.

مواد و روش ها: در مطالعه تجربی حاضر یک جفت پرایمر دژنره طراحی و بهینه سازی گردید و در ترکیب با Hemi Nested PCR برای تشخیص ناحیه V3-Loop ژن env طیف وسیعی از ژنوتیپ‌های ویروس HIV-1 که دارای تغییرات نوکلئوتیدی بسیار شدید است استفاده گردید. روش طراحی شده، برروی 40 نمونه سرم مثبت HIV، 10 کنترل منفی و ژنوم انسانی و 5 نمونه از هر کدام از ویروس‌های HBV,HCV,HGV,TTV انجام شد.

یافته‌ها: پس از بهینه سازی، در 35 مورد از 40 نمونه مثبت باند مورد نظر مشاهده شد. در هیچ یک از نمونه‌های کنترل منفی انسانی و ویروسی هیچ باندی مشاهده نشد. علاوه بر آن در نمونه‌های مثبت باند غیر اختصاصی تشکیل نشده بود.

نتیجه گیری: در این مطالعه علاوه بر PCR متداول، از دو پرایمر دژنره با قابلیت اتصال به نواحی اختصاصی از ژنوم استفاده گردید. در حقیقت محصولات PCR واکنش اول به عنوان DNA الگو برای یک جفت پرایمر داخلی مورد هدف قرار می‌گیرد و منجر به تولید محصولاتی با اندازه‌های کوچک‌تر و با حساسیت بالاتر به دلیل دژنره بودن، خواهد بود. بر اساس یافته‌های مطالعه، روش طراحی شده دارای مزیت‌هایی شامل تأیید محصولات اولیه و افزایش حساسیت روش تشخیص می‌باشد.

واژگان کلیدی: پرایمر دژنره برای PCR، ویروس نقص ایمنی انسان، V3-Loop، واکنش رونویسی معکوس

*** نویسنده مسئول**: دکترای ویروس شناسی، استادیار گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Email: Ravanshad@modares.ac.ir

مقدمه

واکنش زنجیره پلیمراز (Polymerase Chain Reaction-PCR) رایج‌ترین تکنیک در عرصه زیست شناسی مولکولی است که برای تکثیر یک توالی اختصاصی اسید نوکلئیک به کار می‌رود. این روش منجر به تولید مقادیر کافی از توالی مورد نظر برای مقاصد بعدی می‌گردد. همچنین این روش یک پروسه سریع و آسان برای تکثیر توالی مورد نظر فراهم می‌کند و در بسیاری از موارد برتری‌های زیادی نسبت به سایر روش‌های تشخیصی سنتی دارد (1). با وجود سادگی در مفهوم، واکنش PCR نیازمند کنش‌های پیچیده بین توالی هدف، پرایمرها، dNTP(deoxy Nucleotide Triphosphates) و آنزیم پلیمراز به منظور یک تکثیر موفقیت آمیز می‌باشد. طراحی مناسب پرایمر در همراهی با بهینه سازی غلظت اجزای واکنش و مراحل حرارتی باعث ایجاد سطوحی از تطبیق پذیری PCR با شرایط مختلف می‌گردد که در دیگر روش‌های مولکولی وجود ندارد (2). روش‌هایی مانند PCR، واکنش زنجیره لیگاز و زنجیره DNA منشعب (branched DNA-Bdna) که بر اساس عمل بر روی DNA کار می‌کنند، از لحاظ عملکردی بستگی کامل به اتصال پرایمرها به توالی هدف دارند (3). پرایمرها دو توالی DNA ساختگی هستند که به طور کامل یا نسبی مکمل انتهاهای ′3، DNA دو رشته‌ای هستند و به طور معمول دارای طول 30-20 نوکلئوتید هستند (4، 5). وجود دژنره گی بین پرایمر و توالی هدف می‌تواند پایداری دو رشته تشکیل شده را تحت تاثیر قرار داده و نیز ممکن است دارای اثرات شدید بر اختصاصیت PCR باشد، که به نوبه خود قدرت تکثیر یا شناسایی یک سیستم برای توالی مورد نظر را تحت تاثیر قرار می‌دهد (3، 6). پرایمرهای دژنره دارای توانایی تکثیر توالی‌های وابسته اما متفاوت هستند (2). یک پرایمر را در صورتی دژنره می‌نامند که در یک یا چند نقطه مشخص از آن احتمال حضور چندین نوکلئوتید به طور هم‌زمان وجود داشته باشد (4). اثر دژنره گی در توالی پرایمر بر روی کارایی PCR، بستگی به عوامل مختلفی از قبیل طول پرایمر، محل دژنرگی، دمای اتصال پرایمر به الگو و حضور کاتیون‌های یک یا دو ظرفیتی دارد (3). تفاوت در انرژی اتصال پرایمر باعث ایجاد نوعی سوگیری در PCR می‌شود (7). دمای اتصال پرایمر و الگو مهم‌ترین عامل در کارایی پرایمرهای دژنره است، پرایمرهای با دژنره گی زیاد امکان اتصال‌های غیر اختصاصی را بالا برده و باعث کاهش غلظت مولی پرایمرهای صحیح می‌شوند (8).

گزارش شده است که پرایمرهایی که توالی آنها با یک T تمام می‌شوند دارای قدرت تکثیر بیشتری نسبت به پرایمرهایی هستند که توالی آنها با A، C یا G خاتمه می‌یابند (3). ویروس نقص ایمنی انسانی تیپ یک (Human Immunodeficiency Virus - HIV-1) دارای تغییرات ژنتیکی بسیار بالایی است که به دلیل میزان بالای خطای آنزیم رونویسی معکوس ایجاد می‌شود (9)، این تغییرات باعث اختلال در شناسایی موثر ویروس با تکنیک‌های رایج اسید نوکلئیک می‌شود. HIV-1 به سه گروه متفاوتN، M و O تقسیم می‌شود (10). در گروه M هم اکنون 9 ساب تایپ وجود دارد (11). چندین تحقیق، ترکیب پرایمرهای دژنره و PCR با هیبریداسیون ژنومی را گزارش کرده‌اند (12). PCR با الگوی مخلوط باعث ایجاد انحراف در محصول نهایی می‌شود، که این حالت باعث ایجاد یک مسئله جدی در به کارگیری روش‌های مولکولی می‌شود (7).

به طور معمول پرایمرهای با دژنره گی بالا دارای تمایل بیشتری برای تکثیر ژن‌ها از خانواده‌های متفاوت می‌باشند (13) و گونه‌های ویروسی را می‌توان توسط پرایمرهای دژنره اختصاصی ویروس شناسایی کرد (1). در سال‌های اخیر پرایمرهای دژنره برای تکثیر ژن‌های HA و NA ساب تایپ‌های مختلف ویروس آنفولانزای تایپ A به کار رفته‌اند (14). پرایمرهای دژنره علاوه بر ویروس شناسی در دیگر شاخه‌های علوم مولکولی نیز کاربرد وسیعی دارند. این پرایمرها برای پروفایلاینگ سرطان پستان، تشخیص موتانت‌های ژن recA، توالی یابی مستقیم محصولات PCR مورد استفاده قرار گرفته‌اند (8، 12، 15). استفاده از پرایمرهای دژنره نه تنها تشخیص سریع طیف وسیعی از ویروس‌ها را ممکن می سازد بلکه برای توالی یابی

ژنوم‌ها برای اهداف تاکسونومیک نیز مناسب هستند و به کار می‌روند (16). پرایمرهای دژنره کاربردهای وسیعی در مطالعات بیولوژی مولکولی دارند و در تحقیقات متعددی برای تشخیص انواعی از توالی‌های ژنومی به ویژه ویروس‌ها یی مانند HIV، آنفولانزا، پاپیلوما، پوتی ویروس‌ها و کالیسی ویروس‌ها به کار رفته‌اند (1، 14، 20-16).

در مطالعه حاضر ما از یک جفت پرایمر دژنره در ترکیب با Hemi Nested PCR برای تشخیص ناحیه V3-Loop ژن Env طیف وسیعی از ساب تایپ‌های ویروس HIV-1 که دارای تغییرات نوکلئوتیدی بسیار شدید است استفاده کرده ایم.

مواد و روش ها

نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی مجموعه‌ای از بیماران آلوده به عفونت HIV مراجعه کننده به مرکز تحقیقات HIV بیمارستان امام خمینی تهران (ایران) طی سال‌های 1387 تا 1388 بودند. مثبت بودن تمامی نمونه‌ها برای عفونت HIV توسط روش‌های الیزا و وسترن بلات تأیید شده بود. بعد از خون‌گیری، نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه HIV و هپاتیت گروه ویروس شناسی دانشگاه تربیت مدرس منتقل و بعد از جداسازی سریع پلاسما، در دمای منفی 70 درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده ذخیره شدند. RNA ویروسی از 140 میکرولیتر پلاسما طبق دستورالعمل شرکت سازنده با استفاده از کیت استخراج RNA کیاژن (QIAamp Viral RNA mini kit, Qiagen) استخراج شد. اجرای این تحقیق به تصویب کمیته ایمنی زیستی و اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسید. فرم رضایت نامه برای کلیه بیماران شرکت کننده در تحقیق تهیه گردید.

طراحی پرایمر

پرایمرهای طراحی شده در جدول1 نشان داده شده‌اند. این پرایمرها در داخل ژن پوشش ویروس قرار داشتند. طول کل ژن پوشش در ژنوتیپ‌های مختلف حدود 100±2750 نوکلئوتید و طول محصول نهایی حدود 500 جف باز بود. در این مطالعه از سایز مارکر (DNA Ladder, Fermentas) 100 جفت بازی استفاده شد. پرایمرهای اختصاصی، بر اساس هم ردیفی حدود 1000 توالی env از پایگاه ژن بانک (GenBank) با استفاده از نرم افزار Clustal W طراحی شد. در این مطالعه از توالی‌های رفرانس موجود در ژن بانک (Ref. A1. AU. 03. PS1044_Day0. DQ676872, Ref. B. FR. 83. HXB2_LAI_IIIB_BRU.K03455, Ref. C. ZA. 04. SK164B1. AY772699, Ref. D. CD. 83. ELI.K03454) به عنوان توالی مرجع استفاده شد.

این پرایمرها قادر به تکثیر ناحیه بسیار متغییر موجود در ژن پوشش ویروس می‌باشند و بر اساس اطلاعات اولیه ما از ژنوم ویروس به گونه‌ای تغییر داده شدند که ناحیه بسیار متغییر از سویه‌های مختلف را با قدرت بیشتری تشخیص دهند. پرایمرهای نهایی، از بین طیف پرایمرهای طراحی شده، با توجه به ویژگی‌های مورد نظر انتخاب شدند. از نرم افزارهای Oligo Analyzer, Oligo6, Mega 4 (Center of Evolutionary Functional Genomics Biodesign Institute Arizona State University) برای آنالیز خصوصیات پرایمرهای طراحی شده استفاده شد. توالی‌های پرایمری مورد نظر از طریق شرکت فزاپژوه برای ساخت به موسسه آلفا کشور کانادا ارسال شدند.

واکنش رونویسی معکوس

RNA استخراج شده بلافاصله برای واکنش رونویسی معکوس به کار گرفته شد. DNA مکمل (cDNA) با استفاده از یک محلول واکنش شامل آنزیم پلیمراز M-MLV (Promega, cat no: M1701)، و پرایمرهای خارجی پیرو طبق دستورالعمل شرکت سازنده با کمی تغییرات به منظور بهینه سازی شرایط برای آزمایش، ساخته و تکثیر شد. برای اجرای تحقیق 5 میکرولیتر از RNA به محلول واکنش در یک میکروتیوب حاوی 2 میکرولیتر پرایمر اختصاصی اضافه شد که به مدت 5 دقیقه در دمای 70 درجه قرار گرفت، سپس 4 میکرولیتر بافر، 2 میکرولیتر از (Fermentas, Cat no: R0192) dNTP(10mM) و نیم میکرولیتر از مهارکننده RNAse (Fermentas, Cat. (RNAse Inhibitor) (25 unit) (No: EO0381)، اضافه و به مدت 5 دقیقه در 37 درجه قرار داده شد. در مرحله آخر بعد از افزودن یک میکرولیتر از آنزیم (200 واحد) M-MLV (Moloney Murine

Leukemia Virus everse Transcriptase, Promega, cat no: M170A) به مدت 60 دقیقه در دمای 42 درجه سانتی گراد قرار گرفت.

واکنش Nested PCR

هنگامی که هدف بهینه سازی غلظت اجزا و شرایط یک واکنش باشد، یک روش تجربی آزمون و خطا به کار گرفته می‌شود، چرا که هیچ روشی برای پیش بینی کارایی ویژگی‌های انتخاب شده وجود ندارد (1). پرایمرهای این پژوهش بر روی نمونه‌های کنترل مثبت و منفی و نیز برای ارزیابی احتمال اتصال غیراختصاصی به ژنوم ویرس‌های هپاتیت B، C، T و G ((HBV)، (HCV)، (TTV) و (HGV)) و ژنوم انسانی ارزیابی شدند. دیگر اجزای PCR ازقبیل $MgCl_2$ و غلظت پرایمرها، دمای اتصال و تعداد سیکل‌های واکنش توسط چندین گرادیان واکنش از این اجزاء بهینه شدند (شکل 2). بعد از بهینه سازی واکنش، بهترین شرایط PCR در دور اول شامل 5 میکرولیتر از DNA الگو، نیم میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای خارجی، نیم میکرولیتر dNTP ، نیم میکرولیتر taq DNA پلیمراز (Fermentas, Cat no: EP0402)، نیم میکرولیتر MgCl2 (Fermentas, Cat no: R0971) و دو و نیم میکرولیتر بافر PCR (Fermentas, Cat no: B38) دیده شد واکنش تکثیر تحت شرایط دمایی: واسرشتی اولیه به مدت 5 دقیقه در 95 درجه سانتی‌گراد برای یک دور، 30 دور به مدت 40 ثانیه در 94 درجه سانتی‌گراد، 40 ثانیه در57 درجه سانتی‌گراد، 45 ثانیه در 72 درجه سانتی‌گراد و در پایان 7 دقیقه در 72 درجه به عنوان گسترش نهایی قرار گرفت. مرحله دوم واکنش تحت شرایطی مشابه مرحله اول انجام شد به جز این که الگوی واکنش به میزان 2 میکرولیتر از محصول مرحله اول بود.

در مرحله آخر محصول PCR توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز 2 درصد جداسازی و توسط رنگ آمیزی اتیدیوم برماید در حضور نور اشعه ماوراء بنفش آشکار سازی شد (شکل 1). محصولات واکنش به منظور تائید نتایج، برای تعیین توالی به آزمایشگاه بیمارستان طالقانی تهران (دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی) ارسال شدند.

حجم کل نمونه‌ها شامل 40 نمونه مثبت، 10 نمونه کنترل منفی انسانی و 5 نمونه از هرکدام از ویروس‌های HBV، HCV، TTV و HGV بود که به صورت تصادفی انتخاب شدند. برای بررسی رابطه بین روش راه اندازی شده و روش استاندارد طلائی (وسترن بلات) آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. برای این منظور از آزمون کای دو در اثبات رابطه معنی‌دار بین این دو روش استفاده شد.

جدول 1. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه (اختصارات: Y= C,T و R=A,G)

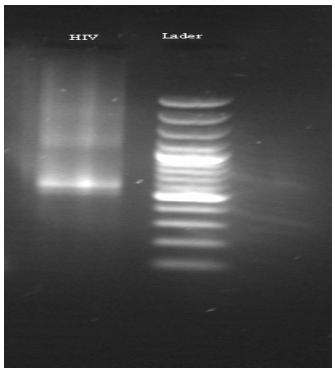
نام پرایمر	توالی پرایمر
HIV - External Forward	CCA ATT CCY ATA CAT TAY TGT GCC
HIV- Internal Forward	TGT TRA ATG GCA GTC TAG CAG
HIV- External Reverse	RAT GGG AGG GGC ATA YAT TG
HIV - Internal Reverse	RAT GGG AGG GGC ATA YAT TG

نتایج

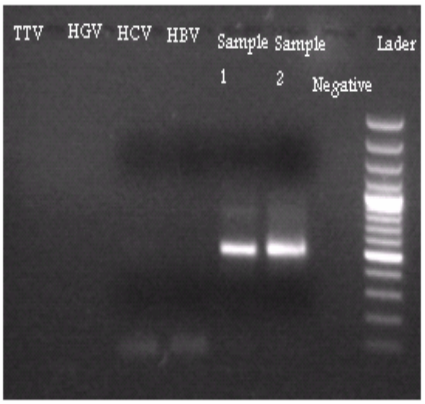
پس از بهینه سازی (شکل 2)، روش طراحی شده بر روی 40 نمونه سرم مثبت HIV، 10 نمونه کنترل منفی و ژنوم انسانی و 5 نمونه از هر کدام از ویروس‌های HBV، HCV، TTV و HGV انجام شد. براساس نتایج به دست آمده از مجموع آزمایشات میزان حساسیت و ویژگی روش طراحی شده، محاسبه شد (جدول 2).

30 عدد از نمونه‌ها دارای جنسیت مرد و10 نفر زن بودند. هیچ یک از بیماران مورد مطالعه تحت درمان ضد HIV نبودند و نیز هیچ کدام دارای علامت بالینی مرحله ایدز نبودند. در 35 مورد از 40 نمونه مثبت باند مورد نظر مشاهده شد. در هیچ یک از نمونه‌های کنترل منفی انسانی و ویروسی باندی مشاهده نشد. در نمونه‌های مثبت باند غیر اختصاصی تشکیل نشده بود اما پس از الکتروفورز

محصولات دور اول PCR یک باند ضعیف مشاهده شد که در نمونه‌های کنترل منفی نیز این باند مشاهده نمی‌شد.



شکل 1. باند مورد نظر HIV قبل از بهینه سازی واکنش PCR



شکل 2. باند بهینه سازی شده HIV به همراه کنترل مثبت و منفی

بحث

روش Nested-PCR همواره به عنوان یک روش سریع و قابل اعتماد جهت تأیید محصول PCR به کار گرفته می‌شود (21).

این روش یک شکل تغییر یافته از PCR معمول است، که در دو مرحله با استفاده از پرایمرهای خارجی و داخلی که به ترتیب در مراحل اول و دوم واکنش وارد می‌شوند، انجام می‌شود. در حقیقت محصولات PCR واکنش اول به عنوان DNA الگو برای یک جفت پرایمر داخلی مورد هدف قرار می‌گیرد و نتیجه کار تولید محصولاتی با اندازه‌های کوچک‌تر خواهد بود. با درک این نکته به آسانی می‌توان 2 مزیت مهم و اصلی این تکنیک را شناخت که عبارتند از: تأیید محصولات اولیه و افزایش حساسیت روش تشخیص.

ترتیب عملکرد و ناحیه هدف پرایمرهای مورد استفاده باعث افزایش اختصاصیت واکنش می‌شود. طبق ارزیابی‌های صورت گرفته روش Nested-PCR باعث افزایش حساسیت تشخیص محصول صحیح به میزان 10^4 برابر خواهد شد که قابل توجه است (21، 22).

پرایمرهای دژنره کاربردهای وسیعی در مطالعات بیولوژی مولکولی دارند و در تحقیقات متعددی برای تشخیص همزمان انواعی از توالی‌های ژنومی از یک یا چندین ارگانیسم به کار رفته‌اند (1، 14، 20-16). از پرایمرهای دژنره برای تکثیر ژن recA در باکتری‌های گرم مثبت با موفقیت استفاده شده است (15). در مطالعه دیگری، یک سری پرایمر دژنره برای تکثیر همزمان چهار ژن متفاوت ویروس آنفولانزا به کار رفته است (14). یک پرایمر دژنره قادر به تکثیر انتهای´ 3 سه گونه متفاوت از کارلا ویروس‌ها است و در یک بررسی نیز برای آنالیز تمام طول ژنوم پوتی ویروس‌ها از تنها دو پرایمر دژنره استفاده شده است (1، 16).

یکی از معایب روش استاندارد PCR نسبت به روش‌های تغییر یافته مانند Nested PCR حساسیت و اختصاصیت پایین‌تر آن است؛ چنان که در این مطالعه، بعد از راه اندازی روش PCR استاندارد و بررسی توانایی آن چندین نکته قابل توجه بود؛ PCR استاندارد حساسیت مناسبی نداشت و عدم حساسیت روش استاندارد از این نکته استنباط شد که چندین نمونه کنترل مثبت فاقد باند بودند. از این رو با هدف افزایش حساسیت و بالا بردن اختصاصیت روش، به بهینه سازی PCR اقدام شد. پارامترهای مهمی را که در Nested PCR برای بهینه سازی می‌توان در نظر گرفت، شامل دمای دورگه شدن پرایمر با DNA الگو، تعداد سیکل‌های مورد استفاده در هر دو دور، غلظت پرایمرها، غلظت یون منیزیم، بافر PCR و بهره‌گیری از تقویت کننده‌های واکنش و غیره می‌باشد (21، 23). در این پژوهش زمان بسیاری در جهت بهینه سازی به کار گرفته شد و این موضوع به دلیل اهمیت این مرحله از کار بود. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به میزان زیادی به صحت اتصال پرایمر بر روی DNA الگو بستگی دارد. بهترین درجه حرارت

برای انجام واکنش در محدوده‌ای قرار دارد که پرایمرها به طور کامل به توالی هدف متصل و از نواحی غیر اختصاصی جدا باشند.

در این جا، برای رسیدن به دمای Tm مناسب (دمای مناسب اتصال پرایمر به الگوی هدف) از دماهای پائین شروع و به طرف دماهای بالا (نزدیک دمای اعمال شده در PCR استاندارد) با فاصله 1/5-1 درجه سانتی‌گراد آزمایش گردید. در این پژوهش ابتدا دماهای مختلف به صورت مجزا در طیف 52 الی 62 درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول 2 . حساسیت و ویژگی محاسبه شده برای روش طراحی شده

نمونه مورد مطالعه	نتایج به دست آمده			
	مثبت واقعی	منفی واقعی	مثبت کاذب	منفی کاذب
کنترل مثبت	35	0	0	5
کنترل منفی انسانی	0	5	0	0
HCV	0	5	0	0
HBV	0	5	0	0
HGV	0	5	0	0
TTV	0	5	0	0
مجموع	35 (%87/5)	25 (%100)	0 (%100)	5(%12/5)

با توجه به این که یون منیزیم ضروری‌ترین یون برای عمل آنزیم پلیمراز Taq و فرایند PCR می‌باشد میزان این یون با میزان dNTPs همواره رابطه مستقیمی دارد، بنابراین به منظور بهینه سازی PCR، واکنش در شیب غلظت $MgCl_2$ در محدوده 0/5 میلی مولار تا 3 میلی مولار مورد آزمون قرار گرفت، تا بهترین غلظت این یون به دست آید. از آنجا که غلظت مخلوط اسیدهای نوکلئیک با غلظت این یون رابطه مستقیمی دارد در این پژوهش همواره غلظت dNTPs ثابت و تنها غلظت $MgCl_2$ بهینه سازی گردید تا نتایج بهتری حاصل شود. در حضور غلظت‌های بالای dNTPs و غلظت‌های نامناسب یون منیزیم، یون آزادی در محیط باقی نخواهد ماند که مورد استفاده آنزیم پلیمراز قرار گیرد، از این رو باعث کاهش کارآیی واکنش PCR خواهد شد. بعد از آزمودن شیب غلظت منیزیم مقدار 1/5 میلی مولار به عنوان بهترین غلظت مورد گزینش قرار گرفت. همان گونه که گفته شد عوامل بسیار زیادی در نتایج Nested-PCR دخیل هستند. در این آزمایش از مقدار توصیه شده بافر توسط شرکت سازنده آنزیم پلیمراز استفاده شد. cDNA الگو از ابتدا به مقدار 5 مایکرولیتر برای دور اول واکنش مورد استفاده قرار گرفت. بعد از ارزیابی مقدارهای متفاوت آن (3، 4 و 5 مایکرولیتر) مشخص شد که تفاوت چندانی در این محدوده از DNA و مقدار محصول دور دوم حاصل نمی‌گردد. در این پژوهش در حین بهینه سازی روش و به خصوص در جهت حذف باندهای غیر اختصاصی، تعداد سیکل‌ها عامل بسیار موثری محسوب می‌شدند. به همین دلیل تعداد سیکل‌ها در دور اول و دوم را باید به گونه‌ای انتخاب کرد،که همواره شدت باند بیشتری در ژل دیده شود، از کارایی روش کاسته نشود و باندهای غیر اختصاصی حذف شده یا به حداقل برسد. برای ارزیابی تعداد سیکل‌ها ماتریکسی از دورهای اول و دوم سنجش گردید. ابتدا در دور اول در طیف 15 تا 35 سیکل (به فاصله 5 سیکل)، PCR انجام گرفت. در دور دوم از هر یک از محصولات دور اول هر سکیل به طور مجزا در سیکل‌های 15 تا 35 تایی مورد آزمایش قرار گرفت و سپس بر روی ژل آگارز 2 درصد ارزیابی گردید. نتایج رضایت بخشی از این ارزیابی حاصل شد به گونه‌ای که در سیکل‌های 25 از دور اول و 30 از دور دوم علاوه بر داشتن محصولات کافی، مشکل باندهای غیر اختصاصی تا حد زیادی مرتفع شد. علاوه بر این با کاهش تعداد سیکل‌های دور اول، زمان زیادی نیز صرفه جویی شد و زمان لازم برای واکنش PCR کاهش یافت. با توجه به این که هدف ما از این مطالعه راه اندازی و به کارگیری یک سیستم PCR قدرتمند برای تشخیص ناحیه V3-Loop ویروس HIV-1 از ژنوتیپ‌های مختلف بود؛ می‌توان گفت که تکنیک PCR دژنره راه

اندازی شده قادر به تشخیص 87/5 درصد از نمونه‌های مثبت و فاقد هرگونه نتیجه مثبت کاذب یا غیر اختصاصی بود. در مطالعات دیگری از پرایمرهای مختلفی برای آنالیز ناحیه V3–loop استفاده شده است (26-24). با مقایسه هم ردیفی پرایمرهای شرح داده شده در این بررسی و دیگر پرایمرهای موجود برای ناحیه V3–Loop با توالی‌های الگو، در نرم افزار Mega4، این پرایمرها دارای قدرت شناخت بیشتر، حداقل به میزان 40-35 درصد بودند. در پایان بر اساس نتایج حاصل از این بررسی به طور خلاصه پیشنهاد می‌شود که استفاده از پرایمرهای دژنره به طور اصولی برای تشخیص ژنوم‌های دارای وابستگی، و استفاده از پرایمرهای این مطالعه برای مطالعات مولکولی، قادر به افزایش قدرت تشخیص ویروس HIV در حد قابل قبولی می باشد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق به نظر می‌رسد که می توان از روش فوق و پرایمرهای معرفی شده، در مراکز تحقیقاتی و بالینی برای تشخیص هم‌زمان و حساس ناحیه V3-Loop ژنوتیپ‌های مختلف ویروس HIV برای مقاصد تحقیقاتی بعدی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ویروس شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد، لذا بدین وسیله از دانشگاه تربیت مدرس که حمایت مالی این تحقیق را به عهده داشته است و همچنین کلیه کسانی که ما را در اجرای این پروژه، با کمک‌های خویش یاری دادند قدردانی می‌کنیم.

منابع

1.J.O. Gaspar a, P. Belintani a, A.M.R. Almeida b, E.W. Kitajima. A degenerate primer allows amplification of part of the 3□-terminus of three distinct carlavirus species. J Virol Methods 2008; 148: 283–5.

2.Shirley Kwok, S.-Y., Chang, John J. Sninsky, Wang A. A Guide to the Design and Use of Mismatched and Degenerate Primers. Genome res 2009; 3: 539-47.

3.Cindy Christopherson, J.S.a.S.K. The effects of internal primer–template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies. Nucleic Acids Res 1997; 25(3): 654–8.

4.Hamed Sh N, N.T., Mahmood Ch. Designing multiple degenerate primers via consecutive pairwise alignments. BMC Bioinformatics 2008; 9: 55.

5.DiGirolamo, N. Algorithms for the Multiple Degenerate Primer Selection Problem. 2008 [cited; 1-10].

6.Burpo, F.J. A critical review of PCR primer design algorithms and crosshybridization case study. biochimestri 2001; 218: 1-12.

7.Kousuke Ishii, M.F. Optimization of Annealing Temperature To Reduce Bias Caused by a Primer Mismatch in Multitemplate PCR. Appl Environ Microbiol 2001; 67(8): 3753-5.

8.Kane, L.A.W.a.C.M. Direct sequencing of PCR products with degenerate primers, in Promega Notes Magazine Number 1993; 8.

9.Leo Heyndrickx, W.J, Le´O Z, Rosemary M, Se´Verin A, Gert V A, Sandra C, et al. Simplified Strategy for Detection of Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group M Isolates by gag/env Heteroduplex Mobility Assay. J Virol 2000; 74(60): 363–70.

10.Martine peeters, f.l., ndongo torimiro, anke bourgeois, eitel mpoudi, laurence vergne, eric saman, et al. Characterization of a Highly Replicative Intergroup M/O Human Immunodeficiency Virus Type 1 Recombinant Isolated from a Cameroonian Patient. J Virol 1999; 73(9): 7368–75.

11.Nicole vidal, m.p., claire m-k, nzila n, david R, wantabala i, hurogo S, et al. Unprecedented Degree of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Group M Genetic Diversity in the Democratic Republic of Congo Suggests that the HIV-1 Pandemic Originated in Central Africa. J Virol 2000; 74(22): 10498-507.

12.Yataro Daigo, S.-F.C., Kylie L. Gorringe, Lynda G. Bobrow, et al Degenerate Oligonucleotide Primed-Polymerase Chain Reaction-Based Array Comparative Genomic Hybridization for Extensive Amplicon Profiling of Breast Cancers A New Approach for the Molecular Analysis of Paraffin- Embedded Cancer Tissue. Am J Pathol 2001; 158(5): 1623-31.

13.Soma Rohatgi, P.G., Devinder S. Systematic design and testing of nested (RT-) PCR primers for specific amplification of mouse rearranged/ expressed immunoglobulin variable region genes from small number of B cells. Journal of Immunological Methods 2008; 339: 205–19.

14.Naresh Jindal A, Y.C., Martha de Abina, Srinand Sreevatsana, David Stallknechtb, David A, et al. Amplification of four genes of influenza A viruses using a degenerate primer set in a one step RT-PCR method. J Virol Methods 2009; 160(1-2): 163-6.

15.Kevin Dybvig, S.K.H., David g. Heath,don B. Clewell,Fei Sun, Ann W. Degenerate Oligonucleotide Primers for Enzymatic Amplification of recA Sequences from Gram-Positive Bacteria and Mycoplasmas. J Bacteriol 1992; 174(8): 2729-32.

16.C. Ha, S.C., P. A. Revill, R. M. Harding, M. Vu, J. L. Dale. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Arch Virol 2008; 153: 25-36.

17.Cloutier, X.-Q.H.a.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 Genetics 2007; 8:18.

18.Catherine A. Harwood, p.j.S., t. Surentheran,irene m. Leigh, ethel-michele de villiers, jane m, et al. Degenerate and Nested PCR: a Highly Sensitive and Specific Method for Detection of Human Papillomavirus Infection in Cutaneous Warts. J Clin Microbiol 1999; 37(11): 3545–55.

19.Cindy Christopherson, J.S.a.S.K. The effects of internal primer–template mismatches on RT-PCR: HIV-1 model studies Nucleic Acids Res 1997; 25: 654–8.

20.Le Guyader F, E.M., Hardy ME, Neill FH, Green J, Brown DW, Atmar RL. Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. Arch Virol 1996; 141(11): 2225-35.

21.Mc Pherson MJ, M.S., The basic PCR. 2000, USA, BIOS.

22.Amini-B-O Sd, Hosseini S Y, Sabahi F, Alavian S-M. HBV genotype and YMDD motif mutation profile among patients infected with HBV and untreated with lamivudine, International j of infect diseases 2006; 12(1): 83-7.

23.Ziyaeyan M, Sabahi F, Alborzi A, Mahboudi F, Karimi M, Pourabbas B. Development of Quantitative Competitive Polymerase Chain Rreaction Assay for Detection and Qualification of HCMV DNA. 2th virology congress in Iran, 2004, Iran, Tehran.

24.Ineˆs Ba´ rtolo , C.R., Jose´ Bartolomeu , Anto´ nio Gama , Rute Marcelino , Marlene Fonseca , et al. Highly divergent subtypes and new recombinant forms prevail in the HIV/AIDS epidemic in Angola: New insights into the origins of the AIDS pandemic. Gen Evol 2009; 9: 672-682.

25.M. Nantezal, F.C.K., M. Monze, U. A. Gompelsl. Detecting undetected HIV-1 variants in African children using degenerate polymerase chain reaction and sequence analyses. Transactions Of the Royal Society Of tropical Medicine And Hygiene 1998; 92: 294-295.

26.Monique N, C.A.B.B., Pauline S, Thomas L, Rob S, Jan A. Stochastic processes strongly influence HIV-1 evolution during suboptimal protease-inhibitor therapy. Med Science 1998; 95: 14441–14446.