مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره دوازدهم، پاییز ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

ساخت اینترنال کنترل تشخیص مولکولی ویروس هپاتیت B به روش PCR-Cloning

محمدحسن شاه حسینی[۱]* ، نسترن زاهدی[۲و۳]، الهام مسلمی[۴]

۱ . دانشگاه آزاد اسلامی- واحد شهر قدس- گروه میکروبیولوژی- تهران-ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات- گروه زیست شناسی- تهران-ایران
۳. موسسه ایرانیان ژن فناور(IGF) - تهران-ایران
۴. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق - گروه زیست شناسی - تهران-ایران

چکیده

سابقه و هدف: در تشخیص هپاتیت ناشی از ویروس هپاتیت B (HBV)، بکارگیری تکنیک های آزمایشگاهی حساس و اختصاصی همچون PCR ضروری است. روشهای سرولوژیکی موجود، قابلیت تشخیص سریع و دقیق آلودگی را نداشته درحالیکه روشهای نوین مولکولی مانند PCR ابزار کارآمدی برای ارزیابی میزان شیوع HBV می باشد. بروز نتایج متفاوت در آزمایشگاهها بدلیل استاندارد نبودن از معایب این تکنیک مولکولی قوی است. یکی از مهم ترین موانع در استفاده وسیع از تکنیک PCR تشخیصی، نداشتن اینرنال کنترل مناسب در اکثر تستهای PCR می باشد. هدف این مطالعه طراحی و ساخت اینترنال کنترل پلاسمیدی (IAC) جهت شناسایی ممانعت کننده ها در تست PCR ویروس هپاتیت B و کاربردهای بعدی در آزمایشگاه های تشخیصی است.

موارد و روش ها: در این مطالعه برای ساخت اینترنال کنترل داخلی، ابتدا پرایمرهای ویژه تست PCR، برمبنای ژن هدف HBsAg ویروس هپاتیت B، بهینه و سپس حساسیت و ویژگی مشخص شد. پرایمرهای مرکب (Composite Primer) برای IAC-HBV نیز طراحی و از طریق PCR تکثیر و سپس کلون گردید. تعداد حداقل IC در هر واکنش PCR از طریق رقیق سازی و همین طور طیف پاسخ PCR همراه با IC مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: اندازه محصول تشخیصی HBV با پرایمرهای اختصاصی آن برابر با ۲۶۲ bp و محصول IAC-HBV برابر با ۶۶۰ جفت باز بود، که از نظر اندازه، اختلاف مطلوب را با هم دارند. تعداد حداقل IC در هر واکنش ۱۰۰۰ عدد تعیین شد. حداکثر حساسیت تست PCR همراه با IC برای DNA ویروس هپاتیت B تا شانزده میلیون پارتیکل ویروس مشخص گردید. در تست ویژگی با عوامل مختلف هیچ محصول ناخواسته ای مشاهده نشد.

نتیجه گیری : استفاده از یک اینترنال کنترل در تشخیص مولکولی ویروس هپاتیت B به عنوان کنترل داخلی، می تواند خطاها را شناسایی و باعث استاندارد شدن این تکنیک حساس شود.

کلمات کلیدی: ویروس هپاتیت B، اینترنال کنترل تکثیری، PCR ، طراحی، ساخت

مقدمه

هپاتیت B یکی از مهمترین بیماری های ویروسی است که در تمام نقاط دنیا از شیوع بالایی برخوردار است. حدود ۴۰۰ میلیون ناقل هپاتیت B در کل دنیا وجود دارد(۱). سالانه نزدیک به ۱ میلیون نفر جان خود را به علت عواقب ناشی از عفونت به این ویروس از دست می دهند(۲). هپاتیت B یکی از عمده ترین مشکلات بهداشتی در جهان به شمار می رود(۳). تاکنون ۸ ژنوتیپ A-H ویروس هپاتیت B شناسایی شده است(۴). از آنجا که این ویروس یکی از شایع ترین عوامل عفونی در دو دهه اخیر بوده که تا کنون درمان قطعی برای آن بدست نیامده و

آدرس نویسنده مسئول : تهران- سعادت آباد خیابان ۲۵- پلاک ۲۵-واحد ۱۹
Email : moslemi.elham@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۱۰/۲۷
تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۸

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.1.5]

تنها به واسطه شناخت افراد مبتلا و رعایت نکات بهداشتی می توان بیماری را کنترل و پیشگیری کرد، لذا کاربرد روشی جهت تشخیص سریع بیماری جهت جلوگیری از انتشار بیماری بسیار کمک کننده خواهد بود و به این ترتیب عامل بیماری زا در مراحل اولیه قابل شناسایی خواهد بود. حساس ترین روش های سرولوژیکی برای یافتن آنتی ژن های HBV و آنتی بادی های آن رادیوایمنواسی و الایزا است، که واکنش بر مبنای برهم کنش اولیه بین آنتی ژن – آنتی بادی صورت می گیرد. وقوع موتاسیون در مولکول های آنتی ژن و یا آنتی بادی سبب کاهش حساسیت تشخیص این روش ها می شود (۷-۵). بعلاوه روشهای تشخیص بر مبنای آنتی بادی در مراحل اولیه بیماری قابلیت تشخیص نداشته و زمان نسبتا زیادی بعد از آلودگی قادر به تشخیص عامل بیماریزا می باشند(۱). روش های تشخیص مولکولی بر مبنای جداسازی و تکثیر اسیدهای نوکلئیک ویروس، شامل روش های مختلفی مانند PCR ، تکثیر هم دما ، دورگه سازی ، تکنیک هیبریداسیون بر مبنای DNA– شاخه دار (bDNA) می باشد که قادر به تشخیص بیماری در مراحل اولیه آلودگی است (۸و۹). در طی چندین سال اخیر ، PCR یک تکنیک تشخیصی و تحقیقاتی مهم و با ارزش برای تشخیص بسیاری از پاتوژنها در نمونه خون یا سرم گردیده است(۱۰). بنابراین مزیت بزرگ تکنیک PCR قابلیت شناسایی و تعیین عفونت در بیماران با ویرمی پایین است که با روش الایزا ممکن است تشخیص داده نشوند (۱۱). مع ذلک، متغیرهایی مانند: نوع آزمایشگاه، دستگاه های مورد استفاده، نوع و بازده DNA پلیمرازمورد استفاده، پرسنل و سطح آموزش و مهارت ها، حضور ممانعت کننده ها، هدفهای ژنی متفاوت در عامل مورد شناسایی، سطح اپتیماسیون با توجه به مهارت ها در آزمایشگاه ها، روش های PCR خانگی (in house PCR) و پارامترهای دیگر، باعث شده که نوعاً در برخی مواردجواب های صحیح و قابل تکرار گزارش نشده و فقط برخی از پروتکل های چاپ شده در مقالات را به طور عملی در آزمایشگاه یا آزمایشگاه های دیگر تکرار کرد(۱۳و۱۲). یکی از مهم ترین مسایل در مقالات چاپ شده در زمینه تشخیص PCR ویروس هپاتیت B، نداشتن اینرنال کنترل در اکثر این مقالات است. بر خلاف کنترل مثبت، اینترنال کنترل عموماً یک سکانس DNA غیر هدف حاضر در نمونه است که به طور همزمان با سکانس هدف تکثیر می گردد. در یک PCR بدون اینترنال کنترل، یک پاسخ منفی یعنی عدم حضور سکانس هدف، که می تواند در عین حال به این معنا باشد که واکنش به دلایلی مانند: اختلال در دستگاه ترموسایکلر، مخلوط PCR نادرست، فعالیت آنزیم DNA پلیمراز، یا حداقل حضور مواد بازدارنده در ماتریکس نمونه، ممانعت شده باشد. به طور بر عکس، در یک PCR با IAC، یک سیگنال کنترل همیشه تولید می گردد که تکثیر اینترنال کنترل می باشد. این کنترل داخلی حتی در عدم حضور سکانس هدف مورد ازمایش، تکثیر می گردد و اگر تکثیر نشود به دلایل مختلفی اشکالی در تکثیر وجود داشته است(۱۴-۱۲). دو استراتژی کلی ۱. اینترنال کنترل رقابتی (Competition IAC) و ۲. اینترنال کنترل غیر رقابتی (Non-competition IAC) برای ساخت IC وجود دارد. با استفاده از تکنیک پرایمر مرکب، هدف و اینترنال کنترل با یک جفت پرایمر، درهمان شرایط (شرایط یکسان) و درهمان لوله (در یک لوله) تکثیر می شوند. دراین استراتژی، همیشه رقابت بین DNA هدف و اینترنال کنترل وجود دارد، لذا میزان اینترنال کنترل جهت حد شناسایی (Detection limit) یک نکته حساس و مهم می باشد. در استراتژی غیررقابتی، پرایمر های هدف و اینترنال کنترل متفاوتند. این استراتژی مستلزم یک تست PCR با دو واکنش متفاوت است که به طور همزمان بایستی جلو روند. وقتی هر دو هدف و IC در این روش تکثیر شوند نتایج معتبر است. از معایب روش تکثیر غیر رقابتی این نکته است که این متد نوعاً به طور دقیق تکثیر تارگت اولیه ناشی از تفاوت در ترادف پرایمرها را منعکس نمی نماید. عیب دوم، این موضوع است که کاربرد IC در فرم غیر رقابتی نیازمند توسعه دو PCR و اپتیمایز کردن آنها در یک شرایط PCR است که می تواند باعث کاهش کار یک تکثیر و یا هر دو هدف و IC گردد(۱۸-۱۵).

هدف مطالعه حاضر، طراحی و ساخت اینترنال کنترل تکثیری تست PCR تشخیصی HBV به روش رقابتی و از طریق PCR-Cloning است.

مواد و روش کار

استخراج DNA از نمونه با تیتر مشخص ویروس هپاتیت B: برای بهینه نمودن تست PCR جهت تشخیص ویروس

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.1.5]

هپاتیت B در نمونه بیماران، ابتدا سرم با تیتر مشخص HBV از آزمایشگاه کیوان تهیه کرده ، سپس با استفاده ازکیت DNP سیناکلون (ایران)، DNA ویروس استخراج گردید. بطور خلاصه مراحل استخراج بترتیب زیر بود:

۱۰۰ میکرولیتر سرم را به یک لوله اپندرف ۱/۵ منتقل کرده و lμ ۵ پروتیناز k به اضافه گردید. نمونه را ۳- ۵ ثانیه ورتکس نموده، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در C ° ۷۲ قرار داده شد. lμ ۴۰۰ بافر لیز کننده (DNG) به نمونه فوق اضافه نموده، سپس به مدت ۵ ثانیه ورتکس گردید. lμ ۳۰۰ محلول رسوب دهنده (ایزوپروپانول) به لوله فوق افزوده ، ۱۰ بار وارونه کرده سپس به مدت ۱۰ دقیقه باrpm۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی را تخلیه کرده ، ml۱ محلول شستشو (اتانول ۷۰٪) به لوله اضافه نموده ،۱۰ بار وارونه کرده و به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. لوله را روی دستمال کاغذی بر گردانده و به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا کاملا خشک شود. lμ۳۰ آب مقطر استریل به لوله اضافه نموده ، به مدت ۵ دقیقه در °C۶۵ قرار گرفت تا DNA به طور کامل به حالت محلول درآمد.

پرایمرها و شرایط PCR:

بهینه نمودن تست PCR برای تشخیص ویروس هپاتیت B، از طریق بهینه نمودن غلظت اجزایی که در واکنش PCR به کار می روند و همچنین طراحی و انتخاب برنامه حرارتی مناسب در دستگاه ترموسایکلر انجام گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، در جدول یک آمده است.

HBV Forward	5`-CAA-GGT-ATG-TTG-CCC-GTT-TG-3`
HBV Reverse	5`-AAA-GCC-CTG-CGA-ACC-ACT-GA-3`
Forward-IC	5'-CAA ggT ATg TTg CCC gTT TgT CgC AgA ACg CCC CTA CC-3'
Reverse-IC	5'-AAA gCC CTg CgA ACC ACT gAA ggg gTT ggT gTA AAA TAg gC-3'

جدول۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص DNA ویروس هپاتیت B و تکثیر اینترنال کنترل.

برای انجام واکنش PCR با استفاده از لوله های ۲۰۰ میکرولیتری و با حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر به ترتیب زیر عمل گردید:

۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی مخصوص HBsAg با غلظت نهایی۰/۴ میلی مول (یک میکرولیتر از غلظت ده میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (X ۱۰)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$) (از غلظت ۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰میلی مولار) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیمTaq DNA Polymerase (بیوفلوکس)، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیترتکثیر یافت. چرخه های حرارتی شامل ۴۰ سیکل متوالی (شامل۹۴درجه سانتی گراد ۴۰ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد ۴۰ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۴۰ ثانیه بود. پس از به پایان رسیدن سیکل های حرارتی، برای مشاهده DNA تکثیر شده از تکنیک الکتروفورز استفاده شد. محصول PCR در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی، بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد و با استفاده از سایبرگرین و نور UV بر روی دستگاه ژل داکومنتیشن، بررسی گردید.

حساسیت و ویژگی

به منظور تعیین حساسیت تست، رقت های مختلف DNA ویروس از ۴ میلیون تا ۴ پارتیکل به روش رقیق سازی تهیه گردید. جهت بررسی ویژگی از اسیدهای نوکلئیک موش ، انسان ، توکسوپلاسماگوندی ، cDNA ی ویروس هپاتیت C ، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ، ساکارومیسس سرویزیه و اشریشیاکلی استفاده شد.

ساخت اینترنال کنترل (IC)

جهت ساخت اینترنال کنترل رقابتی به روش PCR-Cloning، پرایمرهای جلویی و عقبی PCR ویروس هپاتیت B را دربخش ۵' پرایمرهای ژن کینتوپلاست لیشمانیا با اندازه محصول ۶۲۰ جفت باز، بصورت دم (Tail) طراحی و سنتز نمودیم(جدول ۱). برای انجام واکنش PCR جهت تکثیر قطعه اینترنال کنترل، ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده لیشمانیا با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی IC با غلظت نهایی۰/۴ میکرومول، ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10X PCR ، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$) (از غلظت ۵۰ میلی مولار)، ۵ ۰/ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰میلی مولار) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیترتکثیر یافت. چرخه های حرارتی شامل، ۴۰ سیکل متوالی(شامل۹۴درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد ۳۰ثانیه و ۷۲ درجه

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.1.5]

سانتی گراد ۳۰ ثانیه) و یک سیکل پلیمریزاسیون نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ دقیقه بود. پس از به پایان رسیدن سیکل های حرارتی، برای مشاهده DNA تکثیر شده از تکنیک الکتروفورز استفاده شد. قطعه حاصل با پلاسمید pTZ57R کمپانی فرمنتاس به مدت ۱ ساعت در ۲۲ درجه سانتی گراد اتصال و سپس در باکتری اشریشیا کلی JM107 ترانسفورم و کانستراکت حاصل از طریقBlue/White Screening در محیط حاوی آمپی سیلین، X-GAL و IPTG انتخاب گردید. کلونهای مناسب از طریق استخراج پلاسمید با کیت استخراج پلاسمید و تست PCR ، تائید گردیدند.

کلونینگ محصول PCR و اینترنال کنترل

بعد از خالص سازی محصول PCR و IC، با استفاده از کیت T/A cloning کمپانی Thermo scientific هر دو آمپلیکون در وکتور pTZ57/R کلون گردید. پلاسمیدهای حاوی آمپلیکون حاصل با GeneJET Plasmid Miniprep Kit (K0502) کمپانی Thermo Scentific استخراج گردید. سپس با روش PCR، پلاسمیدهای حاوی محصول PCR و IC با استفاده از پرایمرهای تشخیصی تائید گردید.

تعیین غلظت ایده آل IC

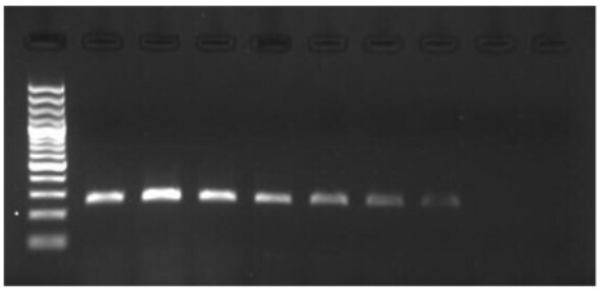
هدف از تعریف غلظت DNA ایده آل IC برای PCR، تائید غلظت متاسب IC است که با تارگت، کمترین رقابت در تکثیر را انجام دهد جهت بدست آوردن غلظت بهینه، غلظتهای متفاوت پلاسمید حاوی IC و DNA ی ویروس هپاتیت B استاندارد مورد آزمایش قرار گرفت. غلظت DNA ویروس هپاتیت B مورد استفاده در تست و هم چنین IC بوسیله اسپکتروفتومتر در A260 تعیین شد. رقتهای حاوی مقادیرDNA ی متفاوت عامل که از طریق serial dilution تهیه شده بود با مقادیر ثابت IC ، تست گردید. برای PCR، ۵ میکرولیتر از DNA ی عامل با ۱ میکرولیتر از IC مخلوط و در میکس PCR استفاده گردید.

توالی یابی

تعیین توالی DNA در دو جهت با استفاده از روش ختم زنجیره (Dideoxy Chain Termination) و بوسیله کمپانی ماکروژن کره انجام گردید.

یافته ها

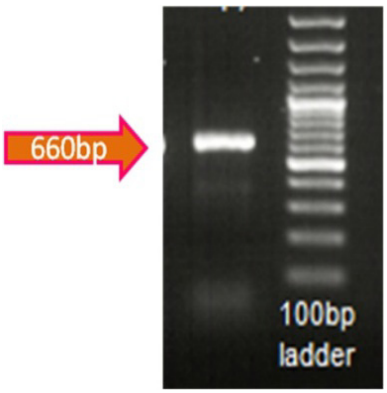
تست PCR بر روی DNA استخراج شده از نمونه با تیتر مشخص، بهینه گردید. در آزمون ویژگی، هیچ محصول نا خواسته ای با DNA موش (Mouse) ، انسان (Human) ، توکسوپلاسماگوندی (*Toxoplasma gondii*) ، ویروس هپاتیت C (*Hepatitis C Virus*) ، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberculosis*) ، ساکارومیسس سرویزیه (*Saccharomyces cervisiae*) ، اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) مشاهده نشد. از طریق تهیه رقت های سری ازDNAی استخراج شده ویروس و انجام تست PCR، حد تشخیص (حساسیت) در حد ۴۰ کپی در نمونه ی مورد آزمایش به دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱. تست حساسیت PCR با استفاده از نمونه های حاوی تعداد DNA ی مشخص HBV .

لاین ۱سایز مارکر 100bp DNA Ladder PLUs (Thermo scientific)، ۲ ; کنترل مثبت ،۳ ; سرم حاوی۴ میلیون پارتیکل، ۴; ۴۰۰هزار پارتیکل، ۵ ; ۴۰هزار پارتیکل ،۶; ۴ هزار پارتیکل، ۷; ۴۰۰ پارتیکل ، ۸ ; ۴۰ پارتیکل، ۹; ۴ پارتیکل ، ۱۰ ;کنترل منفی

قطعه اینترنال کنترل بعد از آمپلیفیکاسیون، کلون و توسط روش PCR تایید گردید. در شکل ۲ محصول تکثیر شده اینترنال کنترل با اندازه ۶۶۰ bp در کنار سایز مارکر 100 bp DNA Ladder Plus مشاهده می گردد.

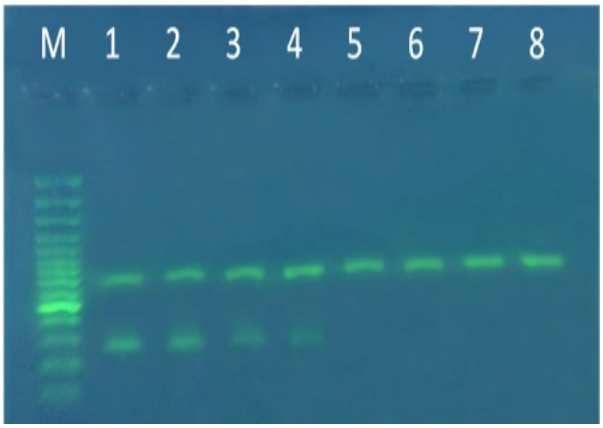


شکل ۲. اینترنال کنترل کلون و تکثیر شده توسط واکنش زنجیره ای پلیمراز.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.1.5]

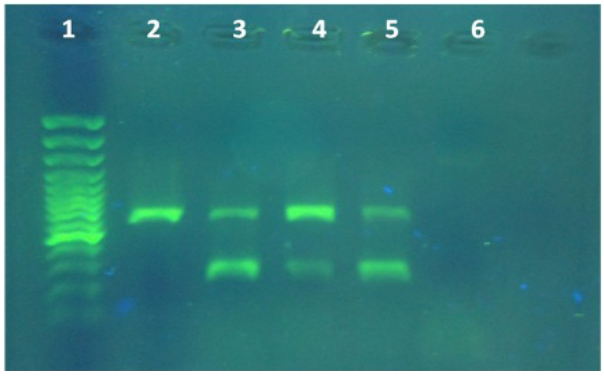
تعداد پلاسمید مناسب جهت اضافه کردن در یک تست PCR تشخیصی حدود ۱۰۰۰ عدد بدست آمد(شکل ۳). برای استاندارد کردن IC، غلظت بکار رفته آن اهمیت critical دارد چرا که حضور مقادیر بالای IC، موجب رقابت با الگوی DNA ژنومیک شده و بنابر این نتیجه منفی کاذب ایجاد می شود. لذا کاربست غلظت 5 fg از IC (معادل ۱۰۰۰ پلاسمید) با ۵ میکرولیتر از DNA ی نمونه استخراج شده، موجب کمترین اثرات رقابتی می گردد.



شکل ۳. تکثیر قطعه ۶۶۰ جفت بازی اینترنال کنترل .

لاین۱. سایز مارکر 100 bp DNA Ladder (Thermo scientific) لاین ۲. PCR با الگوی ده میلیون پلاسمید لاین ۳. PCR با الگوی یک میلیون پلاسمید لاین ۴. PCR با الگوی صد هزار پلاسمید لاین ۵. PCR با الگوی ده هزار پلاسمید لاین ۶. PCR با الگوی هزار پلاسمید لاین ۷. PCR با الگوی ۱۰۰ پلاسمید لاین ۸. PCR با الگوی ۱۰ پلاسمید لاین ۹. PCR با الگوی یک پلاسمید لاین ۱۰ . کنترل منفی

در شکل ۴ نتایج PCR اینترنال کنترل و تست آن با مقادیر متفاوت DNA ی ویروس هپاتیت B از یک عدد تا یک میلیون پارتیکل ویروس مشاهده می شود.



شکل ۴ . الکتروفورز نتایج PCR با تعداد مشخص DNA ویروس هپاتیت B و حاوی اینترنال کنترل:

M . سایز مارکر 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) . نمونه حاوی ۱۰۰۰۰۰۰ DNA ی ویروس هپاتیت B و ۱۰۰۰ پلاسمید واجد IC . ۲. نمونه حاوی ۱۰۰۰۰۰ DNA ی ویروس هپاتیت B و ۱۰۰۰ پلاسمید واجد IC ۳. نمونه حاوی ۱۰۰۰۰ DNA ی ویروس هپاتیت B و ۱۰۰۰ پلاسمید واجد IC ۴. نمونه حاوی ۱۰۰۰ DNA ی ویروس هپاتیت B و ۱۰۰۰ پلاسمید واجد IC ۵. نمونه حاوی ۱۰۰ DNA ی ویروس هپاتیت B و ۱۰۰۰ پلاسمید واجد IC ۶. نمونه حاوی ۱۰ DNA ی ویروس هپاتیت B و ۱۰۰۰ پلاسمید واجد IC ۷. نمونه حاوی یک DNA ی ویروس هپاتیت B و ۱۰۰۰ پلاسمید واجد IC . ۸. کنترل منفی (حاوی صرفا اینترنال کنترل)

تست با ۱۰ نمونه سرم حاوی تعداد مشخص پارتیکل ویروسی (تهیه شده از آزمایشگاه تخصصی ویروس شناسی کیوان که با دستگاه و کیتهای FDA Approved تعداد پارتیکل آنها مشخص گردیده بود) نشانداد که آزمایش حاوی اینترنال کنترل تا نمونه های حاوی ۱۶ میلیون پارتیکل ویروسی می تواند اینترنال کنترل را تکثیر نماید(شکل ۵).

۱ . سایز مارکر 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) .۲. تست PCR حاوی اینترنال کنترل.۳. نمونه حاوی چهار میلیون DNA ی ویروس هپاتیت B و ۱۰۰۰ پلاسمید واجد IC۴. نمونه حاوی یک میلیون DNA ی ویروس هپاتیت B و ۱۰۰۰ پلاسمید واجد IC۵ . نمونه حاوی ۱۶ میلیون DNA ی ویروس هپاتیت B و ۱۰۰۰ پلاسمید واجد IC۶. کنترل منفی (حاوی صرفا الگوب آب)

بحث و نتیجه گیری

امروزه عفونت با ویروس هپاتیت B به عنوان یک مساله مهم بهداشتی و یک مشکل جهانی درآمده است(۱۹). ابتلا به این نوع هپاتیت در بیش از دو میلیارد نفراز مردم جهان اتفاق افتاده و هم اکنون در سراسر دنیا ۵ درصد افراد یعنی در حدود ۴۰۰ میلیون نفر ناقل ویروس هستند. در ایران نیز طبق آخرین آمار رسمی در حال حاضر ۲/۵ میلیون نفر به ویروس هپاتیت B مبتلا شده اند، که حدود ۲-۳ درصد این جمعیت حامل و در حدود ۳۰۰ هزار نفر به بیماری مزمن کبدی، سیروز یا کارسینوم هپاتو سلولار مبتلا می باشند(۲۰). به نظر می رسد که ۷۰-۸۰ درصد هپاتیت های مزمن توسط ویروس هپاتیت B ایجاد می شوند. میزان ناقلین مزمن این ویروس بسیار متغیر بوده بطوریکه کمترین درصد گزارش شده مربوط به استان فارس (٪ ۱/۷) و بیشترین

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.1.5]

آن مربوط به استان سیستان و بلوچستان (۵/۴٪) بوده است. می توان بیان کرد که هپاتیت B به تنهائی مهم ترین عامل بیماری کبدی و اصلی ترین علت مرگ و میر ناشی از هپاتیت در ایران به شمار می رود(۲۱). در سال ۲۰۰۷ CDC اعلام کرد که سالانه ۱ میلیون نفر از هپاتوسلولار کارسینوما و سیروز مرتبط با HBV از بین می روند، این بدان معناست که HBV هر ۳۰ ثانیه منجر به مرگ یک نفر می شود(۲۲).

مهمترین روشهای ایمونولوژیک موجود برای تشخیص عوامل بیماریزای عفونی برمبنای شناسایی کمپلکسهای آنتی‌ژن و آنتی بادی ایجاد شده عمل می کنند و به صورت سیستم‌های مختلفی مانند ۱) فلورو‌ایمونواسی (FIA)؛ ۲) رادیوایمونواسی (RIA)؛ ۳) آنزیم ایمونواسی (EIA) در بازار وجود دارند. مطالعات نشان داده است که آزمایشهای سرولوژیکی به منظور شناسایی HBsAg حدود ۶۰-۵۰ روز پس از عفونت، مثبت می شود، در نتیجه هفته ها بدون اینکه HBsAg قابل تشخیص باشد قابل انتقال است. بنابراین اگرچه روشهای تشخیص سرولوژیکی HBV در حال حاضر بخوبی شناخته شده اند اما شاخص مناسبی برای تشخیص عفونت ویروسی به حساب نمی آیند و برای تشخیص دقیق و سریع عفونت، روشهای مولکولی باید جایگزین روشهای سرولوژیکی شوند(۲۳-۲۵). اصلی ترین مشکل PCR بروز نتایج مثبت و منفی کاذب می باشد. نتایج مثبت کاذب ناشی از آلودگی در آزمایشگاه توسط محصول PCR می باشد که امکان دارد از طریق تانک الکتروفورز و دستگاه UV که منبع بسیار قوی آلودگی هستند به نقاط دیگر آزمایشگاه منتقل شوند که هنگام حمل ژل آگارز از تانک الکتروفورز به دستگاه UV، ذرات آئروسل و آلودگی در فضای آزمایشگاه پخش شده و نتایج مثبت کاذب مشاهده خواهند شد(۲۶). برای حل این مشکل باید مقررات سطح ایمنی زیستی سطح ۲ و فضاسازی و جداسازی محیطها بطور کامل رعایت شده و متناسب با ویژگی های عوامل مورد نظر تدابیر حفاظتی تکمیلی مورد نیاز تأمین گردد(۲۷). یکی دیگر از مشکلات PCR علی رغم حساسیت بالای این سنجش بروز نتایج منفی کاذب است که عمدتا به علت مهارکنندگان PCR می باشد. به نظر می رسد بروز نتایج منفی کاذب به علت وجود مقدار زیاد بازدارنده در نمونه های کلینیکی از جمله مایع پلورال، مایع مغزی- نخاعی(CSF)، خون محیطی و خلط می باشد. آلودگی در آماده سازی DNA و حتی ترکیبات غیر فعال در نمونه نیز می توانند باعث مهار واکنش شوند. در تست های تشخیصی بیماری های عفونی شایع، مهارکنندگان که مسئول ایجاد نتایج منفی کاذب هستند می توانند مشکلات جدی را در بهداشت عمومی ایجاد کنند(۲۸). فاکتورهای دیگری غیر از بازدارنده ها مانند پایین بودن غلظت DNA هدف، نقص در عملکرد ترمال سایکلر، عدم واکنش صحیح DNA پلی مراز و استخراج نا مناسب DNA نیز می توانند عوامل دیگری در ایجاد نتایج منفی کاذب باشد. بروز این خطاها در تست های مولکولی داشتن کنترلهای مناسب را ضروری کرده است. این امر توجه تعدادی از محققین را جلب نمود تا درصدد ایجاد یک کنترل داخلی برای تست های مولکولی به ویژه PCR شوند. در یک تست PCR استاندارد علاوه بر کنترل مثبت و منفی، وجود یک کنترل داخلی از ضروریات است. در یک PCR بدون کنترل داخلی، یک پاسخ منفی (بدون باند یا سیگنال) می تواند به معنای نبود توالی هدف در واکنش باشد، اما همچنین ممکن است به معنی باز داشته شدن واکنش در نمونه باشد. بلعکس در یک PCR که دارای کنترل داخلی است، همیشه یک باند کنترل تولید خواهد شد، حتی هنگامیکه توالی هدف وجود ندارد این امر می تواند مو فقیت و یا عدم موفقیت PCR را نمایان کند(۱۲). بر خلاف کنترل مثبت خارجی، کنترل داخلی یک توالی DNA غیر هدف موجود در لوله مشابه است که به طور همزمان با توالی هدف تکثیر می شود. این DNA غیر هدف یا به صورت مصنوعی طراحی می شود و یا ژن خاصی را به عنوان IC در نظر گرفته که در هر دو صورت ، پرایمر های ویژه آن طراحی می گردد. امروزه اغلب IC های طراحی شده برای PCR پلاسمید های حاوی قطعه ای از DNA می باشند. اغلب این IC های پلاسمیدی حاوی اینسرت، دارای قطعات DNA هومولوگی هستند که دارای ویژگی هایی مانند طول، مقدار GC، ساختار های ثانویه ی احتمالی یکسان با DNA هدف واقعی می باشند(۲۹).

در سال ۱۹۹۴ دانشمندی به نام Kolk برای تشخیص مولکولی *M.tuberclosis* و ساخت IC رقابتی، از قطعه IS6110 موجود در *M.tuberclosis* استفاده نمود. محصول IC تست این مطالعه bp ۳۰۱ و اندازه ی محصول هدف bp ۲۴۵

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.1.5]

بود(۳۰). سال ۲۰۰۰، JONES و همکارانش برای تشخیص عفونت سایتومگالوویروس(CMV) از PCR معمولی و Nested همراه با IC استفاده نمودند. این مطالعه بر روی ۱۴۵ نمونه ی مایع درون کیسه جنین و نمونه های ادرار نوزاد مورد بررسی واقع گردید. برای ساخت IC از باکتریوفاژ لامبدا و پرایمر مرکب استفاده شد و محصول PCR برای کنترل داخلی ۱۵۰ bp و برای DNA هدف ۱۰۰ bp بود. رقت مناسب IC برای این تست ۵۰ کپی تعیین گردید و حساسیت تست برای سنجش PCR معمولی ۱۰۰ پارتیکل و برای Nested PCR ، ۱۰ پارتیکل ویروس تعیین شد(۳۱). در سال ۲۰۰۲، Markus Stocher و همکارانش برای تشخیص PCR معمولی ویروسهای CMV, VZV, HBV ، IC رقابتی را طراحی کردند. برای ساخت اینترنال کنترل ها از ژن نئومایسین فسفوترانسفراز استفاده شد. برای این امر از پلاسمید pGLE-neo که حاوی قطعه اینسرت شده ژن فسفوترانسفراز نئومایسین باکتریایی برای ساخت DNA کنترل داخلی بود، استفاده شد(۳۲). در سال ۲۰۰۳ Stocher و همکارانش جهت شناسایی EBV,CMV,HSV,HBV وVZV توسط real-time PCR با استفاده از تکنیک پرایمر مرکب، IC طراحی نمودند. Heterologous DNA که به عنوان اینترنال کنترل مورد استفاده قرار گرفت، به طور اختصاصی توسط پروب های FRET-hybridisation شناسایی شد. همه ۵ محصول حاصل از multiple internal control DNA با یک جفت پروب FRET-hybridisation اختصاصی منفرد شناسایی شدند(۳۳). بر خلاف دو مطالعه فوق هدف مورد استفاده در این مطالعه ژن کینتوپلاست انگل لیشمانیا می باشد محصول تولید شده نیز دارای سایز متفاوتی است(۳۴-۳۳).

علی رغم استفاده از جدیدترین و دقیق ترین پروتکل ها و یا مجهزترین دستگاها در تست تشخیصی PCR، نمی توان از آن به عنوان یک روش تشخیصی مطمئن و استاندارد نام برد، تا زمانی که کنترل مثبت، کنترل منفی و کنترل داخلی در یک تست PCR وجود داشته باشد. بنابراین در این مطالعه با طراحی و ساخت کنترل داخلی سعی بر استانداردسازی روش PCR در تشخیص HBV گردید.در مطالعه حاضر با توجه به مطالب ذکر شده، از روش رقابتی با بکارگیری تکنیک های پرایمر مرکب و کلونینگ برای ساخت کنترل داخلی تست PCR ویروس هپاتیت B استفاده گردید. سعی شد از ژنی برای ساخت IC استفاده شود که از اختلاف اندازه مناسبی با ژن هدف برخوردار باشد. لذا از ژن کینتوپلاست انگل لیشمانیا جهت طراحی و ساخت IC به روش رقابتی و PCR-Cloning استفاده گردید که اندازه ای برابر با 660bp داشت. به کار گیری ژن کینتوپلاست انگل لیشمانیا برای ساخت اینترنال کنترل در این مطالعه با یک استراتژی هوشمندانه، این مزیت را به همراه داشت که اینترنال کنترل ساخته شده، قابلیت تکثیر در طیف دمایی بهینه برای ژن هدف را دارد. در این روش به دلیل یکسان بودن پرایمر ها، میان کنش بین آنها وجود نداشته که خود مزیت این روش می باشد. پلاسمید ساخته شده نیز یک منبع نا محدودی از کنترل داخلی محسوب می شود و به راحتی می توان مدت زمان طولانی از آن نگهداری کرد.

تقدیر و تشکر:

بدین وسیله از دانشگاه آزاد اسلامی- واحد شهر قدس که هزینه این تحقیق را طی طرح پژوهشی فراهم نمودند تقدیر و تشکر به عمل می آید

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.1.5]

منابع

1. Reddy GA, Dakshinamurthy KV, Neelaparasad P, Gangadhar T, Lakshmi V. Prevalence of HBV and HCV dual infection in patients on haemodialysis . Indian J Med Microbiol. 2005; 23:41-43.
2. Fabrizi F, Martin P.Hepatitis B virus infection in dialysis patients. Am.J.Nephrol. 2000; 20:1-11.
3. Saha D , Agarwal SK. Hepatitis and HIV infection during hemodialysis . J Indian .Med. Assoc. 2001; 99:194-9.
4. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Gunther S, et al. Serological pattern ‘‘anti-HBc alone’’ Report on a workshop. J Med Virol. 2000; 62:450–455.
5. Dienstag JL. Hepatitis B virus infection .The New England journal of medicine .2008; 359.1486-1500.
6. Wang L, Shi L, Alam MJ, Geng Y, Li L. specific and Rapid Detectin of Foodborne salmonella by Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. Food Res Inte.2007; 41 (1):69-74.
7. Weiss JH, Wu B, Farrenkopf T, Schultz G, Song S. Real time TagMan PCR detection and quantitation of HBV genotype A-G with the use of an internal quantitation standard.J.Clin.Virol.2004; 30:86-93.
8. Shahhosseiny MH. Basic Molecular diagnosis. Publisher:Islamic Azad Univesity.2005;12-35.
9. Shahhosseiny MH. Amplification methods in diagnostic microbiology.’ Proceeding of the 4th Congress of the Microbiology, 2001Tehran/IRAN.
10. Hohler T,Gerken G, Notghi A, Lubjohn R,Taheri H,Protzer U,Lohr HF,Schneider PM,Meyer zum Buschenfelde KH,Rittner C.(1997)LHADRB I.Hepatitis B .J Hepatol .26.pp.503-7.
11. Glynn SA,Kleinman SH,Schreiber GB,Busch MP,Wright DJ,Smith JW,Nass CC, Williams AE. Trends in incidence and prevalence major transfusion-transmissible viral infections in US blood donors. Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS). 2000; 284(2):238-40.
12. Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fatch P. 2004. Practical considerations in design of internal amplification controls for Diagnostic PCR assays. J Clin Microbiol. 42(5): 1863-1868.
13. Hoorfar J, and Cook N. 2002. Critical aspects of standardization of PCR. Methods Mol. Biol. 216:51–64.
14. Schoder, D., A. Schmalwieser, G. Schauberger, M. Kuhn, J. Hoorfar, and M. Wagner. 2003. Physical characteristics of six new thermocyclers. Clin Chem. 49:960–963.
15. Burkardt HJ. Standardization and Quality control of PCR analyses. Clin Chem Lab Med. 2000; 38(2): 87-91.
16. Sachadyn P, Kur J. The construction and use of a PCR internal control. Mol Cell Probes. 1998. 12(5):259-262.
17. Abdulmawjood A, Roth S, and Bu¨lte M. Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of Escherichia coli O157 by polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes .2002.16:335–339.
18. Brightwell G, Pearce M, and Leslie D. Development of internal controls for PCR detection of Bacillus anthracis. Mol. Cell. Probes.1998. 12:367–377.
19. Alavian S.M. Hajarizadeh.B., Ahmadzad-Asl.M., Kabir.A, Bagheri-Lankarani.K. Hepatitis B Virus Infection in Iran: A Systematic Review, Hepatitis Monthly; 2008; 8(4).pp. 281-294.
20. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. Vaccine. 2012 Mar 9;30(12):2212-9
21. Alavian SM, Keyvani H, Rezai M, Ashayeri N, Sadeghi HM. (2006) Preliminary report of hepatitis B virus genotype prevalence in Iran. World J Gastroenterol. 12. pp. 5211-3.
22. Center for disease control and prevention . HBV a silent killer.www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/b/hbv-silent-killer. 2007
23. Lee CZ, Huang GT, Yang PM, Sheu JC, Lai MY, Chen DS. Correlation of HBV DNA levels in serum and liver of chronic hepatitis B patients with cirrhosis. Liver; 2002;22.pp.130–5
24. Dienstag .J.L. Hepatitis B Virus Infection. , The New England journal of medicine; 2008;359: pp. 1486-500.
25. Portilho MM, Martins PP, Lampe E, Villar LM.A comparison of molecular methods for hepatitis B virus (HBV) DNA detection from oral fluid samples. J Med Microbiol. 2012 Jun; 61(Pt 6):844-51.
26. Lund M, Madsen M. Strategies for the inclusion of an internal amplification control in conventional and real time PCR detection of Campylobacter spp. in chicken fecal samples. Molecular and Cellular Probes. 2006. 20: 92-99.
27. Shahhosseiny MH, Rahimi AA. 2007. Molecular Genetics: concepts & applications 380 page , publisher : Islamic Azad University. P:180-210
28. Elizabeth CH, Rosa DS. 2008. Internal Control in PCR for Mycobacterium tuberculosis: Usefulness and Improvement of the Diagnosis. Braz. arch. biol. Technol. 51:685-691.
29. Gibson EM, Christian AH, Mickey W. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Research. 6: 995-1001.
30. Kolk AH, Noordhoek GT, Leeuw OD, Kuijper S, Embden DJ. Mycobacterium smegmatis strain for detection of Mycobacterium tuberculosis by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. J. Clin. Microbiol. 1994;32: 1354-1356.
31. Rachel NJ, Lynne N, Brian B, Diana W, julie DF. Development and Application of a PCR-Based Method Including an Internal Control for Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection. J. Clin. Microbiology.2000; 38: 1-6.
32. Markus S, Victoria L, Gabriele H, Jörg B. A simple approach to the generation of heterologous competitive internal controls for real-timePCRassays on the LightCycler. Journal of Virological Methods.2002; 60:53-58.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.12.1.5]