

Comparison of the Effects of Different Master Mixes on the Efficiency of Real-time PCR Technique in Diagnosing Human Papillomavirus (HPV)

Nasim Rahmani¹, Dariush Norouzian^{2*}, Akram Sadat Tabatabaee Bafroee¹

1- Department of Biology, ET.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

2- Nasim Institute, Genomics Pole Laboratory, Health Technology Park, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

*Corresponding Author: Dariush Norouzian, Nasim Institute, Genomics Pole Laboratory, Health Technology Park, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; Email: Dariushnorouzian@yahoo.com

| Received | 28/02/2025

| Revised | 02/04/2026

| Accepted | 18/04/2026

| Abstract |

Background and Aim: Awareness of human papillomavirus (HPV) genotypes is crucial for the management and prevention of dysplasia and cervical cancer. HPV comprises over 200 genotypes, approximately 40 of which infect the genital tract. The global prevalence of HPV varies between 1.2% and 25.6% across different regions.

Materials and Methods: In this descriptive-experimental study, 58 clinical samples were collected from women presenting with vaginitis symptoms at Milad Hospital, Tehran. The presence of the HPV-6 genotype was detected using Real-time PCR with specific primers. To optimize the assay, four different master mix formulations containing varying concentrations of Tris-HCl, KCl, and MgCl₂ were designed and compared for their performance in HPV-6 detection.

Results: Eight (13.79%) of the 58 samples tested positive for HPV-6. The master mix containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, and 2 mM MgCl₂ demonstrated the best sensitivity and specificity, yielding lower Ct values. Melting curve analysis confirmed the specificity of the PCR products and ruled out primer-dimer and non-specific amplification.

Conclusion: Optimization of master mix components in Real-time PCR can enhance the sensitivity and accuracy of HPV-6 detection, providing a more efficient and cost-effective method for genotype identification. This approach may facilitate the development of improved diagnostic kits and increase patient participation in HPV screening programs, ultimately contributing to better prevention of cervical cancer.

| Keywords |

Human Papillomavirus (HPV)|
Real-time PCR| Master Mix|
PCR| Molecular Diagnostic|
Optimization|

| Iau Science |

مقایسه تأثیر مسترمیکس‌های مختلف بر کارایی تکنیک Real-time PCR در تشخیص ویروس پاپیلوما‌ی انسانی (HPV)

نسیم رحمانی^۱، داریوش نوروزیان^{۲*}، اکرم سادات طباطبایی بفرویی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران

۲- مؤسسه نسیم، آزمایشگاه قطب ژنومیکس پارک فناوری سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*نویسنده مسئول: دکتر داریوش نوروزیان، مؤسسه نسیم، آزمایشگاه قطب ژنومیکس پارک فناوری سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،

تهران، ایران؛ پست الکترونیکی: Dariushnorouzian@yahoo.com

تاریخ دریافت | ۱۴۰۳/۱۲/۱۰ | تاریخ ویرایش | ۱۴۰۵/۰۱/۱۳ | تاریخ پذیرش | ۱۴۰۵/۰۱/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: آگاهی از ژنوتایپ‌های ویروس پاپیلوما‌ی انسانی (HPV) برای مدیریت درمان و پیشگیری از رشد و تقسیم سلولی غیرطبیعی و سرطان دهانه رحم بسیار مهم است. ویروس HPV بیش از ۲۰۰ ژنوتایپ دارد که حدود ۴۰ نوع آن باعث عفونت دستگاه تناسلی می‌شود. شیوع جهانی HPV در مناطق مختلف، بین ۱/۲ تا ۲۵/۶ درصد گزارش شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی، ۵۸ نمونه بالینی از زنان مراجعه‌کننده به بیمارستان میلاد تهران با علائم واژنیت جمع‌آوری شد. حضور ژنوتایپ HPV-6 با استفاده از روش Real-time PCR و پرایمرهای اختصاصی بررسی گردید. به منظور بهینه‌سازی واکنش، چهار ترکیب متفاوت مسترمیکس شامل مقادیر مختلف Tris HCl، KCl و MgCl₂ طراحی و عملکرد آن‌ها در تشخیص HPV-6 مقایسه شد.

نتایج: از مجموع ۵۸ نمونه، ۸ نمونه (۱۳/۷۹ درصد) مثبت برای HPV-6 گزارش شدند. نتایج نشان دادند که مسترمیکس حاوی Tris-HCl 10 mM، KCl 50 mM و MgCl₂ 2 mM بهترین عملکرد را از نظر حساسیت و اختصاصیت داشتند و نیز مقادیر Ct پایین‌تری در این گروه مشاهده شد. منحنی ذوب محصولات PCR اختصاصیت واکنش را تأیید کرد و عدم وجود پرایمر دایمر و محصولات غیراختصاصی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: بهینه‌سازی ترکیب‌های مسترمیکس در روش Real-time PCR می‌تواند حساسیت و دقت تشخیص HPV-6 را افزایش دهد و روشی کارآمدتر و مقرون‌به‌صرفه‌تر برای تشخیص این ژنوتایپ ارائه نماید. این رویکرد می‌تواند به توسعه کیت‌های تشخیصی مؤثرتر کمک کرده و مشارکت بیماران در برنامه‌های غربالگری HPV را افزایش دهد که در نهایت به پیشگیری بهتر از سرطان دهانه رحم منجر خواهد شد.

واژگان کلیدی

ویروس پاپیلوما‌ی انسانی (HPV)
Real-time PCR | مسترمیکس
PCR | تشخیص مولکولی
بهینه‌سازی

علوم Iau |

hybridization و Dot blot hybridization است. هرچند Southern blot یک روش استاندارد برای آنالیز ژنوم HPV است، اما به دلیل حساسیت کم و نیاز به مقادیر زیاد DNA، مناسب برای تشخیص این ویروس نیست (۴). کل لوکوس^۳ و همکاران (۱۹۹۲) با توجه به اهمیت HPV اقدام به تشخیص ژنوتایپ‌های مختلف این بیماری با استفاده از روش Dot blot hybridization کردند که نشان داد اگرچه روش دات پلات هیبریداسیون می‌تواند حساسیتی بالا در تشخیص HPV داشته باشد، اما با توجه به زمان‌بر بودن، هزینه‌های زیاد و نیاز به کارکنان آموزش‌دیده روشی مناسب در مطالعه‌های بالینی نمی‌باشد (۵). دسته دوم شامل روش‌های تکثیر نوکلئیک اسید است که با تکثیر DNA ویروسی می‌تواند به تشخیص ویروس بپردازد. این روش‌ها شامل PCR^۴، RFLP-PCR^۵، Real-time PCR^۶ و Genomic sequencing هستند که قادر به شناسایی لود و ژنوتایپ‌های مختلف ویروس با حساسیت بالا هستند (۶). تشخیص زودهنگام و دقیق حضور ویروس در نمونه بیمار برای درمان مناسب، کنترل و پیشگیری از اپیدمی‌ها بسیار مهم است. تکنیک‌های تشخیص مولکولی امکان تشخیص سریع ویروس را فراهم می‌کنند و نسبتاً ارزان، بسیار حساس و اختصاصی هستند (۷). با توجه به افزایش کاربرد روش Real-time PCR در تشخیص عوامل پاتوژن‌های ویروسی و هزینه بالای تولید کیت‌های تشخیصی که بخش اصلی هزینه آن تأمین مسترمیکس است، بهبود مقادیر دقیق و بهینه‌شده می‌تواند موجب افزایش سرعت واکنش، کاهش هزینه‌ها و چرخه بهتر واکنش شود (۸). بنابراین در پژوهش حاضر تغییر مقادیر مسترمیکس شامل کوآنزیم‌های موردنیاز برای اجرای چرخه PCR در کیت‌های تشخیص مولکولی بر پایه تکنیک Real-

عفونت‌های دستگاه تناسلی به‌عنوان یکی از مشکلات جدی سلامتی در سطح جهانی شناخته می‌شوند که تأثیرهای عمیقی بر زنان، مردان و خانواده‌های آن‌ها دارد. این عفونت‌ها می‌توانند پیامدهای متعددی از جمله ناباروری، حاملگی خارج رحمی، دردهای مزمن لگنی و افزایش خطر ابتلا به عفونت HIV^۱ را به‌همراه داشته باشند (۱). یکی از شایع‌ترین ویروس‌های مقاربتی، پاپیلوما ویروس انسانی (HPV)^۲ است که در ۹۰ درصد موارد علائم آن در طی دو سال به‌طور خودمحدودشونده برطرف می‌شود. با این حال در موارد خاص HPV می‌تواند ریسک ابتلا به سرطان‌های دهانه رحم، ولو، واژن، آلت تناسلی، مقعد، دهان و گلو را افزایش دهد. سرطان‌های سیستم تولیدمثل زنان یکی از علل مهم مرگ‌ومیر در سراسر جهان هستند. میزان بروز و شیوع این سرطان‌ها در حال افزایش است و پیش‌بینی می‌شود که تا سال ۲۰۲۵ در کشورهای توسعه‌یافته تا ۴۰ درصد و در کشورهای در حال توسعه تا سه برابر نسبت به سال ۲۰۰۰ افزایش یابد. در ۸۰ تا ۹۰ درصد کارسینوم‌های سلول سنگ‌فرشی و آدنوکارسینومای دهانه رحم و همچنین در ضایعات پیش‌سرطانی دهانه رحم مشاهده شده است. مثبت بودن یک پاپ اسمیر تنها وضعیت ناقصی از HPV را نشان می‌دهد، به‌طوری که عفونت‌های گذشته و حال به‌طور هم‌زمان قابل تشخیص نیستند (۲).

ظهور غربالگری‌های مولکولی، به‌ویژه تکنیک Real-time PCR، تأثیر بسزایی در تشخیص سرطان ایجاد کرده است. این تکنیک می‌تواند اثر متقابل بین HPV کم‌خطر و HPV پرخطر را آشکار سازد و در شناسایی افراد با خطر بالا مؤثر باشد (۳). روش‌های مختلفی برای شناسایی ویروس پاپیلوما انسانی وجود دارد که به‌طور کلی به دو دسته تقسیم می‌شوند: (۱) هیبریداسیون نوکلئیک اسید و (۲) تکثیر نوکلئیک اسید. دسته اول شامل روش‌هایی مانند Southern blot، In-situ

³ Kellokos

⁴ Polymerase Chain Reaction

⁵ Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction

⁶ Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

¹ Human Immunodeficiency Virus

² Human Papillomavirus

بعداً وارد فرایند استخراج گردند. همچنین، روش میکروآری در تشخیص این ویروس حساسیت بالایی دارد و از آنجایی که آزمایشگاه بیمارستان میلاد تهران نمونه‌های تأییدشده با این روش را می‌تواند در اختیار محققان قرار دهد، نمونه‌های کنترل مثبت تأییدشده از این آزمایشگاه جمع‌آوری گردید و نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرد به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی پاسارگارد برای انجام آزمایش‌های بعدی منتقل شدند (۱۰).

۲-۳ | استخراج DNA

برای استخراج DNA ژنومی، از کیت استخراج DNA ژنومی (شرکت تکاپوزیست، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. ابتدا مقدار مشخصی از نمونه در بافر لیز قرار داده شد و با افزودن پروتئیناز K، لیز سلولی و تخریب پروتئین‌ها صورت گرفت. پس از دوره‌ای انکوباسیون در دمای مناسب (معمولاً ۵۶ درجه سانتی‌گراد)، در بن‌ماری (Mammert, Germany) بافر اتصال‌دهنده^۲ به مخلوط افزوده شد و محلول حاصل به ستون حاوی غشای سیلیکا منتقل گردید. در این مرحله DNA به غشا متصل شد و سایر ناخالصی‌ها با شست‌وشو توسط بافرهای شست‌وشو^۳ حذف گردیدند. در نهایت، DNA خالص با استفاده از بافر یا آب بدون نوکلئاز^۴ از ستون جدا و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس جهت بررسی کیفیت DNA استخراج‌شده، یک واکنش PCR معمولی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) با پرایمرهای رفت^۵

(3'-ACCACCTTCAACTCCATCATG-5')

و برگشت^۶

(3'-CTCCTTCTGCATCCTGTCG-5')

time PCR در بهینه‌شدن اجرای واکنش، جهت تشخیص سوبه‌های کم‌خطر HPV ارزیابی خواهد شد.

۲ | مواد و روش‌ها

۲-۱ | جامعه آماری

این مطالعه توصیفی-تحلیلی بر روی ۵۸ زن مراجعه‌کننده به بیمارستان میلاد تهران با علائم بالینی مشکوک به واژنیت انجام شد. معیارهای ورود شامل زنان بالای ۱۸ سال با علائم بالینی (ترشحات غیرطبیعی، خارش و درد) و معیارهای خروج شامل بارداری، مصرف آنتی‌بیوتیک در سه ماه اخیر و سابقه بیماری‌های سیستمیک بود. میانگین سنی افراد ۳۳ سال (دامنه ۱۸-۷۷ سال) بود. تمامی شرکت‌کنندگان پس از دریافت توضیح‌های کامل، رضایت آگاهانه مکتوب خود را اعلام کردند. این پژوهش توسط کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست‌مدیریت دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق بررسی و با کد اخلاق IR.IAU.ET.REC.1402.022 مورد تأیید قرار گرفته است (۹).

۲-۲ | روش نمونه‌گیری

نمونه‌گیری توسط پزشک یا کارشناسان مامایی در شرایط استاندارد با استفاده از برایش نمونه‌برداری از واژن انجام شد و نمونه‌ها به محلول پایه منتقل گردید. سپس نمونه‌ها به فالکون منتقل شده و با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ یخچالدار (Eppendorf, Germany) شدند. مایع رویی دور ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر محلول بافر نمکی فسفات (PBS^۱, Sigma-Aldrich, USA) به رسوب اضافه گردید. این مرحله سه‌بار با همین دور و زمان تکرار شد. در نهایت، ۵۰۰ میکرولیتر PBS به رسوب اضافه شده و توسط دستگاه شیکر (Vortex Mixer, IKA, Germany) کاملاً مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها بین دو میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری تقسیم شده و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد (Electrosteel, Iran) قرار داده شدند تا

² Binding Buffer

³ Wash Buffers

⁴ Nuclease-Free Water

⁵ Forward

⁶ Reverse

¹ Phosphate-Buffered Saline

برای این کار، رقت‌های مختلف از محصول PCR تهیه شد و سپس آزمون Real-time PCR برای آنها انجام شد. از Ct‌های حاصل و غلظت موجود جهت ترسیم نمودار استاندارد استفاده شد. بررسی حضور ژن‌ها براساس فرمول Pfaffl method و Efficiency+1 (-ΔCT) مطالعه‌های انجام گردید. همچنین جهت بهینه‌سازی واکنش، غلظت‌های مختلف ترکیب‌های مسترمیکس در گروه‌های مشخص شده در جدول ۱ مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

جدول ۱- گروه‌بندی ترکیب‌های مسترمیکس برای شناسایی ویروس HPV-6

گروه	ترکیب مسترمیکس
شاهد	مستمیکس تجاری تهیه شده
آزمایشی ۱	مستمیکس + KCl 100 mM + Tris-HCl 20 mM + pH 8.8 / MgCl ₂ 5 mM
آزمایشی ۲	مستمیکس + KCl 50 mM + Tris-HCl 10 mM + pH 8.8 / MgCl ₂ 2 mM
آزمایشی ۳	مستمیکس + KCl 25 mM + Tris-HCl 5 mM + pH 8.8 / MgCl ₂ 1 mM
آزمایشی ۴	مستمیکس + MgCl ₂ 2 mM

۳ | نتایج

در این مطالعه، از میان ۵۸ نمونه بالینی زنان مراجعه‌کننده به بیمارستان میلاد تهران، ۸ نمونه (۱۳/۷۹ درصد) با استفاده از تکنیک Real-time PCR و پرایمرهای اختصاصی HPV-6 مثبت شناسایی شدند. نمونه‌های مثبت شامل شماره‌های ۱، ۴، ۱۴، ۱۸، ۲۹، ۴۵، ۴۸ و ۵۴ بودند. برای ارزیابی بهینه‌سازی مسترمیکس، سه نمونه مثبت به‌طور تصادفی انتخاب و در مرحله بعدی پژوهش با چهار ترکیب مسترمیکس مختلف آزمایش شدند. مقدار Ct³ نشان‌دهنده تعداد چرخه‌های لازم برای رسیدن به سطح آستانه فلورسانس قابل تشخیص است و به‌طور معکوس با مقدار اولیه توالی هدف رابطه دارد؛ یعنی Ct پایین‌تر بیانگر حساسیت بالاتر

بتا-آکتین^۱ انجام گردید (۱۱). واکنش با یک دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه آغاز شد و سپس با ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، آپلینگ در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه ادامه یافت. در نهایت، واکنش با یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه خاتمه یافت. به‌منظور اندازه‌گیری نانوگرم DNA در هر میکرولیتر نمونه، جذب آن در طول موج‌های ۲۸۰ و ۲۶۰ با دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, USA) مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۴ | واکنش Real-time PCR

برای مطالعه وضعیت HPV-6 در نمونه‌های بالینی دریافت‌شده، از روش Real-time PCR استفاده شد. برای تعیین حضور HPV-6² در نمونه بیمار از پرایمرهای اختصاصی HPV-6 شامل پرایمر رفت و برگشت

(3'-TGCAAGAATGCACTGACCAC-5')
(3'-TGCAAGAATGCACTGACCCTGCATGTTG TCCAGCAGTGT-5')

استفاده گردید (۱۲). واکنش Real-time PCR با رعایت دماهای مراحل مختلف شامل دمای واسرشتی ۵۰ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر ۵۶ درجه سانتی‌گراد و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد، طی ۳۵ چرخه انجام شد. آزمون Real-time PCR با استفاده از دستگاه روتورژن شرکت کبازن (Rotor-Gene Q, Qiagen, Germany) و Cap Strip های (SSBio, China) (ساخت چین، سبایو) همراه با رنگ سایبرگرین (SYBR Green I) انجام شد. بازدهی واکنش Real-time PCR با استفاده از فرمول زیر ارزیابی گردید:

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

¹ β-Actin

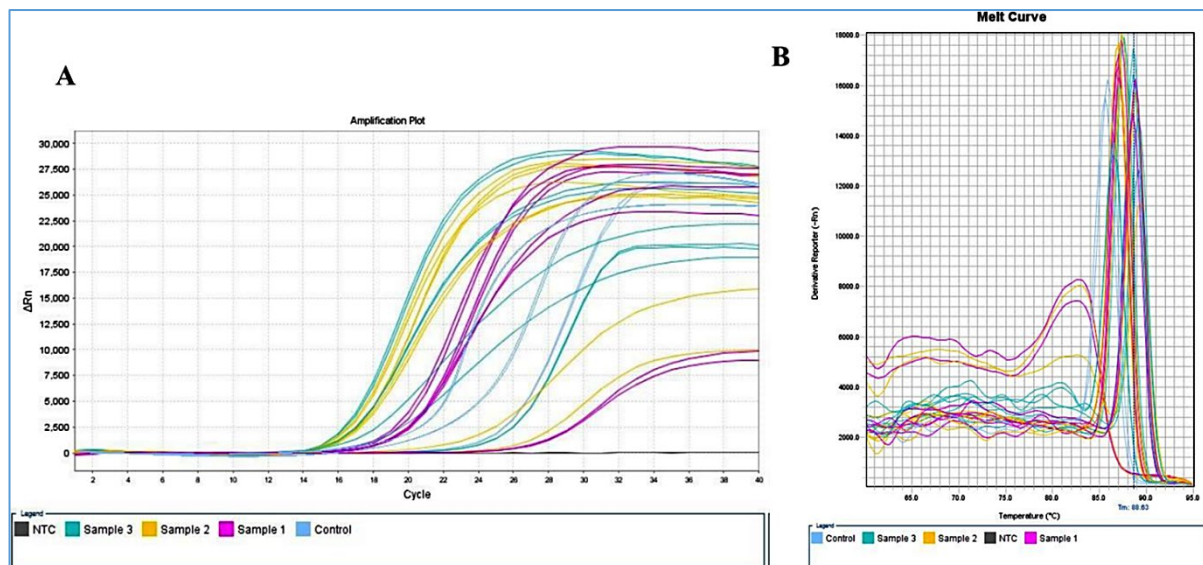
² Human Papillomavirus-6

³ Cycle Threshold

عملکرد را ارائه می‌دهد و می‌تواند به‌عنوان فرمول پیشنهادی برای کیت‌های تشخیصی مولکولی HPV مورد استفاده قرار گیرد.

و بار ویروسی بیشتر است. نمودار منحنی‌های تکثیر حاصل از این گروه‌بندی‌ها در شکل ۱ (A) ارائه شده است. در این مطالعه، گروه دوم مسترمیکس (شامل Tris-HCl 10 mM، KCl 50 mM و $MgCl_2$ 2 mM) کمترین مقدار Ct را نشان داد که بیانگر افزایش حساسیت و کارایی واکنش Real-time PCR در این ترکیب بود. منحنی ذوب برای بررسی اختصاصیت محصولات PCR منحنی ذوب رسم شد. تفسیر گرافیکی این نتایج و پیک‌های حاصل در شکل ۱ (B) قابل مشاهده است. محور x دما و محور y سیگنال نرمالیزه شده فلورسانس (Rn) را نشان می‌دهد. هر پیک در منحنی ذوب نمایانگر یک محصول PCR اختصاصی است. در این مطالعه، وجود یک پیک مشخص در دمای ذوب ۸۸/۶۳ درجه سانتی‌گراد نشان‌دهنده اختصاصیت بالای پرایمرها و تکثیر محصول هدف HPV-6 است. عدم مشاهده پیک‌های اضافی یا پرایمر دایمر تأیید می‌کند که واکنش بدون تولید محصولات غیراختصاصی انجام شده است. درصد مثبت بودن ۱۳/۷۹ درصد در این نمونه‌ها با توجه به شیوع جهانی HPV، معقول و قابل قبول است. مقایسه آماری مقادیر Ct بین گروه‌های مسترمیکس با استفاده از آزمون‌های آماری مناسب (مانند ANOVA یا آزمون‌های ناپارامتری) نشان داد که تفاوت معناداری در حساسیت واکنش وجود دارد و گروه دوم عملکرد برتری دارد. بازدهی واکنش^۱ با استفاده از نمودار استاندارد و فرمول $1 - \text{Efficiency} = 10^{-(1/\text{slope})}$ محاسبه شده و نشان‌دهنده کارایی مطلوب PCR در مسترمیکس بهینه است. این تحلیل آماری و ارزیابی منحنی ذوب نشان می‌دهد که بهینه‌سازی ترکیب‌های مسترمیکس نقش کلیدی در افزایش حساسیت، اختصاصیت و کارایی روش Real-time PCR برای تشخیص HPV-6 دارد. نتایج مطالعه تأیید می‌کند که ترکیب مسترمیکس حاوی Tris-HCl 10 mM، KCl 50 mM و $MgCl_2$ 2 mM بهترین

¹ Efficiency



شکل ۱- ارزیابی مولکولی اختصاصیت و کارایی ترکیب‌های مسترمیکس در شناسایی HPV-6: (A) منحنی تکثیر (Amplification Plot) حاصل از گروه‌بندی ترکیب‌های مختلف مسترمیکس، جهت تعیین نرخ تکثیر؛ (B) نمودار منحنی ذوب (Melting Curve) جهت تأیید اختصاصیت محصول تکثیرشده و تفکیک ژنوتایپ.

۴ | بحث

در این مطالعه، از ۵۸ نمونه بالینی زنان مراجعه‌کننده به بیمارستان میلاد تهران با علائم واژینیت، ۸ نمونه (۱۳/۷۹ درصد) با استفاده از تکنیک Real-time PCR و پرایمرهای اختصاصی HPV-6 مثبت شناسایی شدند. در حالی که استفاده از پرایمرهای عمومی مانند GP5+/GP6+ در برخی مطالعات منجر به شناسایی تعداد محدودی از نمونه‌های مثبت یا حتی عدم شناسایی آن‌ها شده است (۱۲)، نتایج پژوهش حاضر نشان‌دهنده حساسیت بالاتر پرایمرهای اختصاصی HPV-6 در تشخیص دقیق‌تر این ژنوتایپ است. همچنین، گزارش شده است که استفاده از پرایمرهای اختصاصی‌تر (مانند MY09/MY11) در مقایسه با روش‌های عمومی، منجر به افزایش چشمگیر حساسیت و اختصاصیت در شناسایی ژنوتایپ‌های HPV می‌شود (۱۳).

این تفاوت‌ها بیانگر این نکته است که غربالگری HPV تنها با استفاده از PCR معمولی ممکن است منجر به از دست رفتن داده‌های مهم اپیدمیولوژیک شود. به همین دلیل، توسعه روش‌های پیشرفته‌تر مانند Real-time PCR که حساسیت و دقت بالاتری در تشخیص و ژنوتایپینگ HPV دارند، مورد توجه قرار گرفته است.

سرطان دهانه رحم، یکی از شایع‌ترین انواع سرطان‌ها در میان زنان در سطح جهان است و عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) به‌عنوان عامل اصلی آن شناخته می‌شود. با توجه به شیوع بالای عفونت‌های HPV و ارتباط آن‌ها با بروز سرطان، تشخیص زودهنگام و دقیق این ویروس اهمیت ویژه‌ای دارد (۱۳). در این راستا، توسعه و بهینه‌سازی کیت‌های تشخیصی می‌تواند نقش بسزایی در کاهش بار بیماری و بهبود نتایج درمانی ایفا کند.

هدف اصلی مطالعه حاضر، بهینه‌سازی ترکیب مسترمیکس در کیت‌های تشخیصی Real-time PCR برای تشخیص ویروس پاپیلومای انسانی ژنوتایپ-6 (HPV-6) بود تا روشی کارآمدتر، دقیق‌تر و مقرون‌به‌صرفه‌تر ارائه شود. نوآوری این پژوهش در تنظیم مقادیر بهینه اجزای مسترمیکس شامل Tris-HCl، KCl و $MgCl_2$ است که منجر به افزایش حساسیت و اختصاصیت واکنش Real-time PCR گردید. این بهینه‌سازی علاوه بر کاهش هزینه‌های آزمایشگاهی، کارایی تشخیص HPV-6 را به‌طور قابل توجهی ارتقا می‌دهد.

(۱۶). این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر که نمونه‌های مثبت HPV-6 را شناسایی کرده است، هم‌خوانی دارد و اهمیت تشخیص دقیق و بهینه‌سازی روش‌های Real-time PCR برای شناسایی ژنوتایپ‌های مختلف HPV در جمعیت ایرانی را تأکید می‌کند.

عامل کلیدی برای موفقیت qPCR، در دسترس بودن مخلوط‌های واکنشی است که امکان تقویت و تکثیر DNA را در حضور رنگ متصل‌شونده به DNA یا پروب فلورسنت می‌دهد (۱۷). یک جزء مهم از مسترمیکس‌های qPCR، آنتی‌بادی مونوکلونال ضد Taq است که فعالیت آنزیمی DNA پلی‌مراز مقاوم در برابر حرارت را غیرفعال می‌کند. آنزیم پس از دناتوره شدن آنتی‌بادی در اولین مرحله دناتوراسیون چرخه PCR دوباره فعال می‌شود. این به اصطلاح «شروع داغ» PCR تشکیل محصولات غیراختصاصی PCR را کاهش می‌دهد (۱۸). مسترمیکس Real-time PCR دارای تمام اجزا (بافر، نوکلئوتیدها، آنزیم و آنتی‌بادی) دو برابر غلیظ‌شده است. قبل از qPCR فقط DNA الگو، پرایمرها، آب و در برخی موارد پروب الیگونوکلئوتیدی فلورسنت اضافه می‌شود. غلظت الگوی مورد استفاده در واکنش PCR باید با توجه به کیفیت DNA و همچنین تعداد چرخه‌های واکنش در نظر گرفته شود. استفاده بیش از حد از الگوی DNA می‌تواند منجر به آنیلینگ پرایمر خارج از هدف و همچنین سنتز ضعیف DNA شود. تغییر تعداد چرخه‌های واکنش می‌تواند بازده محصول PCR را بهبود بخشد (۱۹). غلظت dNTP مورد استفاده بستگی به طول DNA دارد که باید تقویت شود. قطعات DNA طولانی‌تر به غلظت‌های بالاتر dNTP نیاز دارند. با این حال، غلظت بیش از حد می‌تواند واکنش PCR را مهار کند. مقدار dNTP کمتر از حد مطلوب نیز منجر به ازدیاد طول ناقص می‌شود. غلظت معمولی dNTP مورد استفاده بین ۴۰ تا ۲۰۰ میکرومولار برای هر یک از چهار dNTP است (۲۰). یون منیزیم چندین عملکرد را در واکنش Real-time PCR انجام می‌دهد: یک کوفاکتور ضروری برای DNA پلی‌مرازها محسوب می‌شود، DNA دورشته‌ای را

با این حال، هزینه‌های بالای مواد اولیه و تجهیزات مورد نیاز این روش‌ها، فشار اقتصادی قابل توجهی بر بیماران وارد می‌کند که می‌تواند مانع پیگیری و انجام غربالگری‌های منظم شود.

مطالعه‌های اپیدمیولوژیک در ایران نشان داده‌اند که HPV-6 یکی از شایع‌ترین ژنوتایپ‌های کم‌خطر در جمعیت زنان و مردان است و شیوع آن در گروه‌های سنی مختلف قابل توجه است. این امر اهمیت بهینه‌سازی روش‌های تشخیصی دقیق، حساس و مقرون‌به‌صرفه را برای مدیریت بهتر عفونت‌های HPV و پیشگیری از عوارض مرتبط، از جمله زگیل‌های تناسلی برجسته می‌سازد.

ورگرا و همکاران^۱ در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای بر روی نمونه‌های ادرار و ترشحات دهانه رحم با استفاده از روش Real-time PCR مبتنی بر رنگ سایبرگرین و پرایمرهای PGMY انجام دادند و سپس ژنوتایپ نمونه‌ها را با روش Reverse Line Blot تعیین کردند. در این مطالعه، ۱۶ ژنوتایپ پرخطر و ۱۵ ژنوتایپ کم‌خطر در نمونه‌های دهانه رحم و ۱۶ ژنوتایپ پرخطر و ۱۴ ژنوتایپ کم‌خطر در نمونه‌های ادرار شناسایی شد که میزان هماهنگی نتایج بین این دو نوع نمونه ۸۶/۲ درصد گزارش گردید (۱۴). همچنین، نیا و همکاران^۲ در بازه زمانی ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۶ با استفاده از روش Real-time PCR فراوانی ژنوتایپ‌های HPV را در زنان و مردان ایرانی بررسی کردند که نتایج نشان‌دهنده شیوع بالای HPV-6 و HPV-16 در هر دو گروه بود (۱۵). در مطالعه جابری‌پور و همکاران^۳ (۲۰۱۱) نیز بیماران مبتلا به کارسینوما نئوپلاستیک و مهاجم سرویکس با تکنیک Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفتند و توالی‌یابی محصولات PCR نشان داد که فراوانی ژنوتایپ‌های HPV-16، HPV-18، HPV-6، HPV-31 و HPV-45 به ترتیب ۷۵، ۳، ۷، ۱ و ۱ درصد بوده است

¹ Vergara et al.

² Niya et al.

³ Jaberipour et al.

این مخلوط‌ها طبیعی است و نشان‌دهنده اختصاصیت محصولات PCR است (۲۱). این نتایج با مطالعه‌های پیشین که تأثیر ترکیب مسترمیکس و زیرساخت‌های مختلف بر عملکرد Real-time PCR را بررسی کرده‌اند همسو است. به‌عنوان مثال استیفنز^۱ و همکاران (۲۰۱۰) پنج مسترمیکس مختلف را برای تشخیص ویروس ابولا ارزیابی نمودند (۲۲) و بوزارد^۲ و همکاران (۲۰۱۲) چندین زیرساخت و مسترمیکس تجاری را برای شناسایی عوامل بیوتروریسم مقایسه کرده‌اند (۲۳). همچنین آیشید^۳ و همکاران (۲۰۱۵) کاربرد چهار مخلوط مسترمیکس را در تشخیص آلرژن میگو با Real-time PCR بررسی کردند (۲۴). تمامی این مطالعه‌ها اهمیت انتخاب مسترمیکس و زیرساخت مناسب را در بهبود حساسیت و کارایی روش‌های PCR تأیید کرده‌اند.

از سوی دیگر، مسترمیکس‌ها با کاهش مراحل پیچیدگی، احتمال خطاهای انسانی و آلودگی متقاطع را کاهش می‌دهند که برای حفظ حساسیت بالای PCR ضروری است. در طراحی مسترمیکس، ترکیب‌های ثابت به‌صورت یکجا اضافه می‌شوند و تنها اجزای متغیر مانند پرایمرها به‌صورت جداگانه افزوده می‌شوند تا خطاهای پیچیدگی کاهش یافته و تکرارپذیری نتایج افزایش یابد.

این مطالعه، دارای چند محدودیت مهم نیز است که باید در نظر گرفته شود: نخست، حجم نمونه نسبتاً کوچک (۵۸ نمونه) ممکن است قابلیت تعمیم نتایج به جمعیت‌های وسیع‌تر را محدود کند، علاوه بر این تمرکز مطالعه صرفاً بر ژنوتیپ HPV-6 بوده و نتایج ممکن است برای سایر ژنوتیپ‌های ویروس HPV متفاوت باشد.

برای پژوهش‌های آتی پیشنهاد می‌شود که حجم نمونه افزایش یابد و نمونه‌ها از مراکز مختلف و مناطق جغرافیایی متنوع جمع‌آوری شوند تا پوشش جامع‌تری از تنوع ژنتیکی

تثبیت می‌کند و دمای ذوب را بالا می‌برد. یون منیزیم با غلظت بیش از حد منجر به کاهش پایداری و اختصاصیت Taq پلی‌مراز و افزایش محصولات غیراختصاصی می‌شود. غلظت طبیعی منیزیم کلرید مورد استفاده بین ۰/۵ و ۵ میلی‌مولار است. با این حال، اگر غلظت‌های dNTP تغییر یابد، ممکن است نیاز به تنظیم غلظت منیزیم وجود داشته باشد (۱۹). بنابراین، دقت و قابلیت اطمینان یک سنجش Real-time PCR به بهینه‌سازی دقیق هر جزء از واکنش PCR بستگی دارد. در برخی موارد، سنجش ممکن است به بهینه‌سازی گسترده نیاز نداشته باشد، اما برای سنجش‌های Real-time PCR که برای اندازه‌گیری چالش‌برانگیز مانند تعیین کمی دقیق تفاوت‌های کوچک در مقادیر اسید نوکلئیک (چه DNA یا RNA)، تشخیص مطمئن پاتوژن‌های با حساسیت بالا یا تمایز خاص پلی‌مورفیسم‌ها لازم است. بهینه‌سازی کامل پروتکل PCR، معرف‌ها، ابزار دقیق و روش‌های آنالیز یک پیش‌نیاز حیاتی برای به دست آوردن نتایج معتبر و قابل تکرار با بیشترین ویژگی و حساسیت است. در این مطالعه، چهار گروه آزمایشی با ترکیب‌های مختلف مسترمیکس و یک گروه کنترل شامل مسترمیکس تجاری تهیه‌شده تعریف گردید. این مسترمیکس‌ها بر روی سه نمونه مثبت HPV-6 با استفاده از روش Real-time PCR ارزیابی شدند. نتایج نشان دادند که گروه دوم که شامل ترکیب بهینه Tris-HCl 10 mM، MgCl₂ 2 mM و KCl 50 mM بود، بهترین عملکرد را از نظر مقادیر Ct ارائه داد. این یافته با نقش کلیدی یون منیزیم به‌عنوان کوفاکتور DNA پلی‌مراز و تأثیر آن بر پایداری DNA دو رشته‌ای و دمای ذوب هم‌خوانی دارد. غلظت بهینه منیزیم کلرید بین ۰/۵ تا ۵ میلی‌مولار است و غلظت بالاتر می‌تواند منجر به کاهش اختصاصیت آنزیم و افزایش محصولات غیراختصاصی شود که در مطالعه حاضر نیز این موضوع مشاهده شد.

منحنی‌های ذوب حاصل از مسترمیکس‌های مختلف تفاوت‌های جزئی داشتند که به دلیل ترکیب‌های متفاوت

¹ Stephens et al.

² Buzard et al.

³ Eischeid et al.

خدمات تشخیصی در مراکز بهداشتی و بهبود سلامت عمومی جامعه خواهد شد.

۶ | ملاحظات اخلاقی

این پژوهش، طبق اصول بیانیه هلسینکی انجام شده است. طرح تحقیق در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق تصویب گردیده است. پیش از نمونه‌گیری، اهداف مطالعه برای تمامی شرکت‌کنندگان تشریح و رضایت‌نامه کتبی آگاهانه اخذ شد. همچنین به شرکت‌کنندگان اطمینان داده شد که تمامی اطلاعات شخصی آن‌ها محرمانه باقی خواهد ماند.

۷ | تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از حمایت‌های معاونت پژوهشی و همکاری‌های صمیمانه دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق در فراهم آوردن بستری لازم جهت انجام این پژوهش قدردانی نمایند.

۸ | تعارض منافع

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که در انجام این پژوهش و انتشار نتایج حاصل از آن، هیچ‌گونه تضاد منافی (اعم از مالی، شخصی یا سازمانی) با سایر افراد یا مجموعه‌ها وجود ندارد.

۹ | سهم نویسندگان

نسیم رحمانی: انجام آزمایش‌ها و فرایندهای عملیاتی پژوهش، جمع‌آوری داده‌های اولیه و نگارش پیش‌نویس مقاله. داریوش نوروزیان: طراحی مطالعه، نظارت عالی بر روند پژوهش، تحلیل متدولوژی، بازبینی نهایی و مسئولیت مکاتبات مقاله.

اکرم سادات طباطبایی بفرویی: نظارت بر تحلیل‌های آماری، تفسیر یافته‌ها و ویرایش فنی و علمی متن مقاله.

۱۰ | کد اخلاق

کد اخلاق مقاله به شرح زیر می‌باشد:

IR.IAU.ET.REC.1402.022

ویروس فراهم گردد. همچنین، مقایسه کیت‌های بهینه‌سازی شده با سایر روش‌های تشخیصی مانند PCR معمولی، روش‌های مولکولی دیگر یا توالی‌یابی نسل جدید^۱ (NGS) می‌تواند به ارزیابی دقیق‌تر حساسیت و اختصاصیت هر روش کمک کند. ادامه پژوهش‌ها به منظور بهینه‌سازی مقادیر سایر اجزای مسترمیکس نیز ضروری است تا ترکیب‌های بهینه‌تر و کارآمدتری توسعه یابد.

در نهایت، ارزیابی عملکرد بالینی و اثربخشی کیت‌های بهینه‌سازی شده در محیط‌های بالینی واقعی از اهمیت بالایی برخوردار است تا اطمینان حاصل شود که این کیت‌ها در شرایط عملی و متنوع بالینی نیز عملکرد قابل قبولی دارند و می‌توانند به عنوان ابزاری قابل اعتماد در تشخیص HPV-6 مورد استفاده قرار گیرند.

۱۵ | نتیجه‌گیری

در این مطالعه، از میان ۵۸ نمونه زنان مراجعه‌کننده به بیمارستان میلاد تهران، ۸ نمونه (۱۳/۷۹ درصد) با تکنیک Real-time PCR مثبت تشخیص داده شدند که نشان‌دهنده شیوع قابل توجه HPV-6 در این جمعیت است. یافته‌های این پژوهش تأکید می‌کنند که انتخاب و بهینه‌سازی ترکیب مسترمیکس، به‌ویژه استفاده از ترکیب Tris HCl 10 mM، KCl 50 mM و MgCl₂ 2 mM، می‌تواند حساسیت و دقت واکنش Real-time PCR را به‌طور چشمگیری افزایش دهد. این موضوع اهمیت طراحی دقیق و علمی مسترمیکس‌ها را در توسعه کیت‌های تشخیصی مولکولی نشان می‌دهد. بنابراین، غربالگری با استفاده از روش مولکولی بهینه‌سازی شده، ابزاری حیاتی در شناسایی به‌موقع افراد در معرض خطر است و توسعه کیت‌های تشخیصی مقرون‌به‌صرفه با ترکیب‌های بهینه‌سازی شده در این مطالعه، می‌تواند نقش مهمی در افزایش مشارکت بیماران در برنامه‌های غربالگری و پیشگیری مؤثرتر از سرطان دهانه رحم ایفا کند. این رویکرد در نهایت منجر به ارتقای کیفیت

¹ Next-Generation Sequencing

| **Extended Abstract**

Human Papillomavirus (HPV) is a primary etiological factor for cervical cancer and various genital infections globally. Among its numerous genotypes, HPV-6 is frequently associated with benign lesions and respiratory papillomatosis, making its accurate detection crucial for clinical management. This study aimed to investigate the prevalence of HPV-6 in a specific female population and to systematically optimize the biochemical environment of the Real-time PCR master mix to enhance diagnostic sensitivity and accuracy in clinical settings.

In this descriptive-laboratory study, 58 clinical samples were collected from symptomatic women at Milad Hospital, Tehran. Following DNA extraction, the presence of the HPV-6 genotype was investigated using Real-time PCR with specific primers targeting the L1 region. Four distinct master mix formulations were designed, varying the concentrations of Tris-HCl, KCl, and MgCl₂. The optimization focused on identifying the ideal ionic strength and cofactor concentrations to maximize enzymatic efficiency while minimizing non-specific amplification.

Molecular analysis revealed that 8 out of 58 samples (13.79%) were positive for HPV-6. The master mix containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, and 2 mM MgCl₂ demonstrated the best performance, yielding the lowest Cycle Threshold (Ct) values and robust amplification signals. Melting curve analysis confirmed the high specificity of the reaction, showing a single sharp peak and the total absence of primer-dimers or non-specific products, ensuring the reliability of the diagnostic results even in samples with lower viral concentrations.

The results indicate that meticulous optimization of master mix components significantly improves the limit of detection for HPV-6. This approach provides a more efficient and cost-effective method for molecular diagnostics, facilitating the development of improved screening kits. Ultimately, such technical enhancements contribute to better cervical cancer prevention strategies and encourage higher patient participation in screening programs by offering more accurate, reliable, and accessible diagnostic outcomes for clinical evaluation.

| **Keywords**

Human Papillomavirus, HPV-6, Real-Time PCR, Master Mix Optimization, L1 Region, Molecular Diagnostics, Cervical Cancer Screening.

1. Brunham RC, Paavonen J. Reproductive system infections in women: lower genital tract syndromes. *Pathogens and disease*. 2020;78(5):ftaa022.
2. Xie L, Li Q, Dong X, Kong Q, Duan Y, Chen X, et al. Investigation of the association between ten pathogens causing sexually transmitted diseases and high-risk human papilloma virus infection in Shanghai. *Molecular and Clinical Oncology*. 2021;15(1):1-7.
3. Trzcinska A, Zhang W, Gitman M, Westra W. The prevalence, anatomic distribution and significance of HPV genotypes in head and neck squamous papillomas as detected by real-time PCR and Sanger sequencing. *Head and Neck Pathology*. 2020;14:428-34.
4. Keung ES, Souers RJ, Bridge JA, Faquin WC, Graham RP, Hameed MR, et al. Comparative performance of high-risk human papillomavirus RNA and DNA in situ hybridization on college of American pathologists' proficiency tests. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2020;144(3):344-9.
5. Kellokoski J, Syrjänen S, Yliskoski M, Syrjänen K. Dot blot hybridization in detection of human papillomavirus (HPV) infections in the oral cavity of women with genital HPV infections. *Oral microbiology and immunology*. 1992;7(1):19-23.
6. Galvão AM, Erket MHF, de Medeiros ALPB, Martins DBG, Lima Filho JL, de Araujo RFF. Polimorfismo da glutathione-S-transferase P1 e marcadores de estresse oxidativo em mulheres infectadas por papilomavírus humano. | Glutathione-S-transferase P1 polymorphism and oxidative stress markers in women infected by human papillomavirus. 2021.
7. Kombe Kombe AJ, Li B, Zahid A, Mengist HM, Bounda G-A, Zhou Y, Jin T. Epidemiology and burden of human papillomavirus and related diseases, molecular pathogenesis, and vaccine evaluation. *Frontiers in public health*. 2021;8:552028.
8. Kim Y-T, Serrano B, Lee J-K, Lee H, Lee S-W, Freeman C, et al. Burden of Human papillomavirus (HPV)-related disease and potential impact of HPV vaccines in the Republic of Korea. *Papillomavirus Research*. 2019;7:26-42.
9. Dastyar V, Mohammadi A. Investigating the empowerment of the physically-handicapped people and its related factors: A cross-sectional, analytical study in Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad province in 2015. *Archives of Rehabilitation*. 2019;19(4):354-69.
10. Arbyn M, Smith SB, Temin S, Sultana F, Castle P. Detecting cervical precancer and reaching underscreened women by using HPV testing on self samples: updated meta-analyses. *Bmj*. 2018;363.
11. Abreu AL, Souza RP, Gimenes F, Consolaro ME. A review of methods for detect human
12. Bartosik M, Moranova L, Izadi N, Strmiskova J, Sebuyoya R, Holcakova J, Hrstka R. Advanced technologies towards improved HPV diagnostics. *Journal of medical virology*. 2024;96(2):e29409.
13. Shah SS, Senapati S, Klacsmann F, Miller DL, Johnson JJ, Chang H-C, Stack MS. Current technologies and recent developments for screening of HPV-associated cervical and oropharyngeal cancers. *Cancers*. 2016;8(9):85.
14. Vergara N, Espinoza G, Balanda M, Quiero A, Hidalgo W, San Martín H, et al. Prevalence of Human Papillomavirus infection among Chilean women from 2012 to 2016. *Journal of Medical Virology*. 2017;89(9):1646-53.
15. Niya MHK, Kesheh MM, Keshtmand G, Basi A, Rezvani H, Imanzade F, et al. Integration rates of human papilloma virus genome in a molecular survey on cervical specimens among Iranian patients. *European Journal of Cancer Prevention*. 2019;28(6):537-43.
16. Jaberipour M, Samsami A, Sahraian F, Kazerooni T, Hashemi M, Ghaderi A, Habibagahi M. Elevation of HPV-18 and HPV-16 DNA in the plasma of patients with advanced cervical cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011;12(1):163-7.
17. Thirion L, Dubot-Peres A, Pezzi L, Corcostegui I, Touinssi M, de Lamballerie X, Charrel RN. Lyophilized matrix containing ready-to-use primers and probe solution for standardization of real-time PCR and RT-qPCR diagnostics in virology. *Viruses*. 2020;12(2):159.
18. Bhadra S, Maranhao AC, Paik I, Ellington AD. One-enzyme reverse transcription qPCR using Taq DNA polymerase. *Biochemistry*. 2020;59(49):4638-45.
19. Kang SJ, Jang CS, Son JM, Hong KW. Comparison of seven commercial TaqMan master mixes and two real-time PCR platforms regarding the rapid detection of porcine DNA. *Food Science of Animal Resources*. 2021;41(1):85.
20. Reiter M, Kirchner B, Müller H, Holzhauser C, Mann W, Pfaffl M. Quantification noise in single cell experiments. *Nucleic acids research*. 2011;39(18):e124-e.
21. Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomolecular detection and quantification*. 2017;14:19-28.
22. Stephens KW, Hutchins RJ, Dauphin LA. Cross-platform evaluation of commercial real-time reverse transcription PCR master mix kits using a quantitative 5' nuclease assay for Ebola virus. *Molecular and cellular probes*. 2010;24(6):370-5.
23. Buzard GS, Baker D, Wolcott MJ, Norwood DA, Dauphin LA. Multi-platform comparison of ten commercial master mixes for probe-based real-

time polymerase chain reaction detection of bioterrorism threat agents for surge preparedness. Forensic science international. 2012;223(1-3):292-7.

24. Eischeid AC, Kasko SM. Quantitative multiplex real-time PCR assay for shrimp allergen:

Comparison of commercial master mixes and PCR platforms in rapid cycling. Journal of food protection. 2015;78(1):230-4.