مبانی Real-Time PCR و تکنولوژی FRET در تشخیص بیماری های عفونی

عباس دوستی[1]، محمد کارگر[2]، صادق قربانی دالینی[3]، میثم سرشار[4]

[1]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، [2]گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، [3]دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان، [4]مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)

*نویسنده مسئول: *abbasdoosti@yahoo.com*

چکیده

Real-time PCR یکی از تکنیک‌های مولکولی است که در زمینه تشخیص آزمایشگاهی تحولات شگرفی ایجاد نموده است. این روش تلفیقی از تکنیک PCR و تکنیک کاربرد پروب های فلورسنس است که هر دو در یک واکنش جمع گردیده اند. به طور کلی در این روش نوین، واکنش PCR و شناسایی قطعه تکثیر یافته در یک ساعت یا کمتر انجام می شود که این امر باعث افزایش سرعت و صرفه جویی در زمان نسبت به سیستم های رایج PCR گردیده است. مزیت دیگر این تکنیک نسبت به PCR این است که، مراحل Post PCR که شامل ژل الکتروفورز، رنگ آمیزی با ماده سرطانزای اتیدیوم بروماید و تفسیر ژل با نور ماورای بنفش می باشد، حذف گردیده و آلودگی محیط آزمایشگاه به اتیدیوم بروماید و قطعات DNA تکثیر یافته به روش PCR نیز به حداقل می رسد. کار با تجهیزات و دستگاه های بکار گرفته شده در انجام روش real-time PCR به طور قابل ملاحظه ای نسبت به PCR ساده تر بوده و مجموعه مزایایی نظیر ترکیب حساسیت و ویژگی بالا، خطر آلودگی پایین، ساده تر بودن کارکرد و سرعت بالا، باعث شده است تا فناوری real-time PCR جذاب تر از روش های رایج بر پایه کشت یا تست های ایمونولوژیکی در آزمایشگاه های میکروبیولوژی بالینی برای تشخیص عوامل بیماریزا گردد. هدف از این مطالعه، معرفی روش real-time PCR و تکنولوژی های آن در تشخیص بیماری های عفونی می باشد.

کلمات کلیدی: پروب، Real-time PCR، FRET

مقدمه

رنگ های فلورسنس نشانگرهای مهمی در تکنیک های زیستی می باشند که با ورود آنها به عرصه بیولوژی مولکولی تحولی عظیم در امر تشخیص و تحقیق بوجود آورده اند. این رنگ ها که نور منتشر شده از آن ها در محدوده طیف مرئی می باشد به طور گسترده ای در روش های آنزیمی، میکروسکوپی و دارو شناسی مورد استفاده قرار گرفته اند. تعیین توالی ژنوم انسان که یکی از برجسته ترین کارهای دانشمندان می باشد، توسط تکنیک های تشخیص فلورسنسی انجام گردید. اولین سیستم خودکار real-time PCR توسط شرکت Applied Biosystem و بر پایه رنگ فلورسین و مشتقات رنگ رودامین به صورت تجاری ساخته و مورد استفاده قرار گرفت. تغییر مهم دیگر با توسعه سیستم های تشخیصی فلورسنس در رنگ مادون قرمز نزدیک و با استفاده از رنگ های NIR یا Near-infrared که امروزه به عنوان IRDye ® شناخته می شود، به وجود آمد. این سیستم تشخیصی برای اولین بار در سال

۱۹۹۳ توسط شرکت LI-COR® Bioscience تجاری سازی گردید و مزایای بسیاری مانند استفاده از رنگ هایی با طول موج بالاتر، پویاتر کردن این سیستم، کاهش در مقدار سیگنال فلورسنس پیش زمینه و نهایتا افزایش حساسیت سیستم را از خود به جای گذاشت. سیستم تعیین توالی NIR با استفاده از رنگ های مادون قرمز IRDye ، استاندارد جدیدی را برای میزان دقت و تعیین طول قطعات به وجود آورد (Osterman and Schutz-Geschwender, 2007). تشخیص آزمایشگاهی بیماری های عفونی در گذشته بر پایه کشت آنها در محیط آزمایشگاهی بوده است. از این رو زنده ماندن میکروارگانیسم ها در محیط برون تن، با استفاده از تقلید شرایط درون تن بوده است که منجر به تکثیر موفق میکروارگانیسم در خارج از بدن میزبان می گردد. در فناوری های بر پایه نوکلئیک اسید، شناسایی را با استفاده از ماده ژنتیکی اختصاصی میکروارگانیسم که شاخص وجود آن است، انجام می دهند که یکی از پیشرفته ترین این تکنیک ها، real-time PCR می باشد (Mackay, 2004; Nissen and Sloots, 2002; Gulliksen et al., 2004)

تکنیک real-time PCR و تکنولوژی FRET

فناوری شناسایی نوکلئیک اسید بر پایه FRET (Fluorscence Resonance Energy Transfer) از تلفیق PCR و آشکارسازی لحظه به لحظه نور فلورسنس به وجود آمده است. از لحاظ تاریخی، شناسایی بر پایه فلورسنس در علوم زیستی به خوبی شناخته شده است و با موفقیت جایگزین نشانه گذاری ایزوتوپ های رادیواکتیو گردیده است. رنگ های فلورسنس دارای یک مزیت محیطی هستند: آنها دارای نیمه عمر طولانی تر، هزینه پایین برای پاکسازی و دفع و کاربرد ایمن – بر خلاف ایزوتوپ های رادیواکتیو – هستند. وجود دو فاکتور کلیدی باعث شده است تا real-time PCR فلورسنسی مفید واقع شود. اول اندازه گیری همزمان چند فاکتور با استفاده از رنگ های مختلف و دوم اندازه گیری و کسب اطلاعات در هر لحظه به صورت پیوسته. افزایش در سیگنال فلورسنس در یک سیستم یکپارچه در طول چرخه های تکثیر آشکار می شود. بنابراین حساسیت مطلق، به عنوان یک فاکتور قطعی، برای این روش تشخیصی زیاد نیست، به ویژه که اکثر کارکردهای آن بر اساس تکثیر نوکلئیک اسید می باشد (Tang and Stratton, 2006).

Real-time PCR، فلورسنس منتشر شده در طول واکنش را به عنوان یک فاکتور غیرمستقیم از آمپلیکون های (Amplicons) جمع شده توسط هر چرخه از PCR و در پایان هر چرخه را تجزیه و تحلیل نموده و نمایش می دهد. سیستم ها و روش های متنوع FRET که اجازه نمایش real-time فلورسنس در مجموعه PCR را می دهند، نوید بزرگی را در تشخیص بیماری های عفونی می دهند. اهمیت real-time PCR به عنوان یک ابزار تشخیصی را می توان در دو جنبه مهم خلاصه کرد. اول، تعیین محصول تکثیر شده از ژن هدف با استفاده از پروب ها و آنالیز ذوب که با دقت زیادی با آنالیز اندازه گیری توسط الکتروفورز ژل بعد از PCR که مستعد به آلودگی است مقایسه می شود. دوم، آنالیز کمی غلظت های بسیار متنوعی از ماده هدف اولیه، با استفاده از پیشرفت نمایشی تجمع دینامیک سیگنال های FRET در طول زمان مقدور می گردد که این مساله درحضور استانداردهای اولیه انجام می گردد. چندین نوع real-time PCR وجود دارد و برای مشاهده خواسته های متنوعی از روش های طراحی شده برای آنالیز های خاص

تجاری شده اند (Higuchi Tang and Stratton, 2006 et al., 1993;).

مبانی فناوری FRET

سیستم real-time PCR برپایه شناسایی و اندازه گیری کمی مولکول گزارشگر فلورسنس است که یا در بین DNA دو رشته ای و یا به صورت کووالان به پروب اختصاصی متصل می باشد. افزایش سیگنال فلورسنس در ارتباط مستقیم با مقدار محصول PCR در مخلوط واکنش است. زمان یا چرخه ای از PCR، جایی که سیگنال فلورسنس به صورت معنی داری افزایش می یابد، مرتبط با مقدار اولیه مواد در تیوب نمونه می باشد. با اندازه گیری مقدار فلورسنس ساتع شده در پایان هر چرخه، بدست آوردن اطلاعات از مخلوط واکنش در فاز تصاعدی (exponential phase) PCR مقدور می گردد. افزایش فلورسنس در فاز لگاریتمی می تواند از روی یک منحنی ذوزنقه ای معمولی – جایی که اولین افزایش معنی دار در مقدار محصول PCR با مقدار اولیه نمونه در ارتباط است، مقایسه شود. بیشترین تعداد کپی از نوکلئیک اسید هدف، کمترین چرخه برای ثبت افزایش معنی دار در فلورسنس را نیاز دارد (C_t : شماره چرخه ای است که فلورسنس مشاهده شده در آن ۱۰ برابر بالاتر از مقدار پایه است). روش های شیمیایی مختلفی با خصوصیات تشخیصی مختلفی توسعه یافته اند که شامل: رنگ های متصل شونده به DNA (Intercalating dyes)، پروب های هیدرولیز شونده (Hydrolysis probes)، پروب های هیبرید شونده (Hybridization probes) و بیکون های مولکولی (Molecular beacons) می باشد (جدول ۱ و تصویر ۱) (Lee et al., 1993; Livak et al., 1995)

رنگ های متصل شونده به DNA

ساده ترین و ارزان ترین روش تشخیصی در real-time PCR نیازمند رنگی است که نور فلورسنس را زمانی منتشر کند که بین دو رشته DNA قرار گرفته باشد. سیگنال فلورسنس متناسب با مقدار تمام DNA دورشته ای موجود در مخلوط واکنش شامل محصولات اختصاصی و غیر اختصاصی تکثیر شده و کمپلکس پرایمر-دایمر است. از اینرو، این روش یک روش اندازه گیری اختصاصی برای توالی نیست. SYBR Green یک ماده فلورژن است که به شیار کوچک DNA متصل می شود و در محلول واکنش، فلورسنس کمی را ساتع می کند اما در زمانی که به DNA دو رشته ای متصل می شود سیگنال فلورسنس قوی را منتشر می کند. به دلیل اینکه این رنگ قادر به افتراق بین مولکول های مختلف DNA دو رشته ای در واکنش PCR نیست، از تولید آمپلیکون های غیر اختصاصی باید ممانعت شود. از اینرو طراحی و بهینه سازی شرایط واکنش نیازمند تست های آزمایشی گسترده ای می باشد. آنالیز دمای ذوب (Melt-curve analysis) بعد از پایان واکنش PCR قادر به فراهم آوردن ویژگی بیشتری همراه با کنترل های استاندارد است (Ririe et al., 1997; Morrison et al., 1998).پروب های هیدرولیزشونده (TaqMan Probes) اساس شیمیایی پروب های هیدرولیز شونده یا TaqMan وابسته به فعالیت '۵→'۳ اندونوکلئازی آنزیم Taq-پلیمراز است. یک پروب DNA نشاندار شده به یک رنگ گزارشگر (Reporter dye) و یک رنگ خاموش کننده (Quencher dye) در دو انتهای مختلف توالی DNA به گونه ای طراحی می گردد که به بخش درونی آمپلیکون متصل شود. زمانی که پروب در غیاب توالی اختصاصی اش نور ساتع می کند، رنگ فلورسنس تحریک

شده، انرژی اش را به رنگ مولکولی خاموش کننده منتقل می کند (این امر FRET نامیده می شود). بنابراین، زمانی که پروب سالم است، نزدیک بودن گزارشگر و خاموش کننده مانع انتشار هرگونه فلورسنسی می شود. در حضور توالی اختصاصی، زمانی که پلی مراز در حال تکثیر الگویی است که پروب TaqMan به آن متصل است، فعالیت '۵ اندونوکلئازی باعث شکسته شدن پروب می شود. با از بین رفتن فعالیت خاموش کننده (در حالت FRET)، رنگ گزارشگر شروع به انتشار فلورسنسی می کند که با پیشرفت چرخه و افزایش مقدار شکست پروب ها افزایش می یابد. انباشت محصولات PCR با به نمایش در آمدن افزایش فلورسنس رنگ گزارشگر شناسایی می شود (قابل ذکر است که پرایمرها نشاندارنشده اند). معمولا پروب طویل تر از پرایمر بوده (طول پروب ۲۰-۳۰ باز و T_m آن ۱۰ درجه سانتی گراد بیشتر از پرایمر است) و حاوی رنگ فلورسنس در انتهای '۵ و رنگ خاموش کننده در انتهای '۳ است. رنگ های FAM (6-carboxyfluorescein) و TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamin) رایج ترین رنگ هایی هستند که به ترتیب به عنوان گزارشگر و خاموش کننده استفاده می شوند. فرآیندهای هیبرید شدن و شکستن، با تجمع تصاعدی (exponential accumulation) محصول هدف تداخل نمی کنند (جایگاه اتصال پرایمر و پروب همپوشان نمی باشد). یکی از احتیاجات اختصاصی رنگ های فلوروژن این است که در انتهای '۵ نباید G وجود داشته باشد. مجاور شدن یک G با رنگ گزارشگر باعث خاموش شدن فلورسنس گزارشگر بعد از شکسته شدن می گردد. پروب های TaqMan به تغییرات تک نوکلئوتیدی (mismatch) نسبتا حساس می باشند. زمانی که نمونه های زیستی را تکثیر می کنیم که تغییرات ژنتیکی می توانند حضور داشته باشند که باعث از بین رفتن سیگنال در نمونه های مثبت می شود، این مساله بسیار پر اهمیت می شود. متاسفانه، این حساسیت می تواند پروب های TaqMan را برای بررسی های ژنوتایپینگ نامناسب کند زیرا نبود سیگنال می تواند نشان دهنده یک ژنوتایپ ناشناخته باشد (Hiyoshi and Holland et al., 1991; Hosoi, 1994; Chen et al., 1997).

پروب های هیبرید شونده دوتایی (Dual Hybridization Probes)

این روش تشخیصی بر اساس خصوصیت FRET دو پروب الیگونوکلئوتیدی مجاور می باشد. زمانی که هر دو پروب به طور اختصاصی به توالی هدف خود متصل شده باشند، انرژی ساتع شده از رنگ دهنده (Donor dye) باعث تحریک رنگ گیرنده (Acceptor dye) پروب دوم می شود که متعاقبا رنگ گیرنده نور فلورسنس را با طول موج بالاتری منتشر می کند. یک پروب با فلوروکروم دهنده (fluorescein) در انتهای '۳ نشانه گذاری می شود و پروب دیگر با رنگ پذیرنده (Cy5, LC Red 640) در انتهای '۵ نشانه گذاری می شود. هر دو پروب قادر به هیبرید شدن به توالی هدف بوده و دو پروب بیش از ۳ نوکلئوتید با هم فاصله ندارند (٤ تا ۲۵ آنگسترم فاصله مولکولی). رنگ اول (fluorescein) با استفاده از منبع نوری فیلتر شده با LED (light emitting diode) تحریک می شود و نور فلورسنس سبز را در طول موج کمی بلندتر ساتع می کند. زمانی که دو رنگ در مجاورت یکدیگر و به مانند یک پروب به طور همزمان به هدف خود متصل می شوند، نور ساتع شده باعث تحریک رنگ پذیرنده (مانند LC Red 640) متصل به پروب هیبرید شده دوم می شود که متعاقبا نور فلورسنس قرمز را با طول موج بالاتری منتشر می کند. وقوع فرایند FRET با نمایش در کاهش نور ساتع شده از رنگ دهنده و متعاقبا افزایش نور ساتع شده از رنگ پذیرنده

نشان داده می شود. نسبت بین فلورسنس دهنده و فلورسنس پذیرنده در طی PCR افزایش می یابد و متناسب با مقدار DNA هدف تکثیر شده است. مزیت پروب های هیبرید شونده نسبت به پروب های هیدرولیز شونده، در تولرانس نسبی آنها به تغییرات تک نوکلئوتیدی است و از این رو مناسب بودن آنها برای کارهای ژنوتایپینگ در ترکیب با آنالیز آستانه دمایی است. مشکل آن در نیاز به یک توالی بزرگتر برای قرار گیری دو پروب می باشد (Nitsche et al., 1999; Wittwer et al., 1997).

بیکون های مولکولی (Molecular Beacons)

بیکون های مولکولی، پروب های هیبرید شونده با ساختار ساقه–حلقه ای هستند که رنگ های فلورسنس و خاموش کننده در دو انتهای ساقه به گونه ای قرار گرفته اند که در مجاورت هم واقع شوند. رنگ های فلورسنس رایج آن شامل FAM، TAMRA، TET و ROX و رنگ خاموش کننده رایج آن نیز DABCYL می باشد. در غیاب توالی هدف، FRET بین رنگ فلورسنس و خاموش کننده مانع از انتشار و تحریک نوری می شود. در حضور توالی اختصاصی، خاصیت مکملی قطعه حلقه پروب منجر به هیبرید شدن آن با توالی هدف و دور شدن دو انتهای پروب می گردد که متعاقبا باعث کم شدن خاصیت خاموش کننده و افزایش در مقدار فلورسنس قابل شناسایی می گردد (از بین رفتن خصوصیت FRET). از آنجا که هیبرید فضایی سنجاق سر از لحاظ دمایی بسیار پایدار است، بیکون های مولکولی به طور اختصاصی به هدف متصل می شوند که این امر منجر به تمایز بین اختلافات تک نوکلئوتیدی می گردد. از اینرو، بیکون های مولکولی برای بررسی جهش ها و یافتن پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی در زمانی که جهش های خاصی شناسایی شده اند مطلوب می باشند(McKillip and Drake, 2000; Szuhai et al., 2001; Abravaya et al., 2003; Bustamante et al., 2004; Vet and Marras, 2005). از لحاظ شیمیایی تمامی real-time PCR ها قادر به شناسایی چندین گونه از DNA (multiplexing) با استفاده از هر کدام از پروب–بیکون با جفت فلور–کوئینچ اختصاصی خود می باشند. تمامی موارد ذکر شده در بالا قادر به همراهی با آنالیز منحنی دمایی و یا فقط با SYBR Green می باشند. با استفاده از multiplexing، هدف/اهداف و کنترل درونی قادر به شناسایی در یک لوله می باشند (Bernard et al., 1998; Lee et al., 1999; Vet et al., 1999; Elnifro et al., 2000; Read et al., 2001). با توجه به طول موج باید بین خاموش کننده و گزارشگر هماهنگی لازم وجود داشته باشد. به این منظور خاموش کننده و گزارشگر های متناسب با یکدیگر در شکل ۲ آمده است.

انتخاب توالی هدف

به منظور شناسایی اختصاصی یک میکروارگانیسم یا یک گروه از میکروارگانیسم ها (مانند استرپتوکوک گروه A یا جنس مایکوباکتریوم)، تعیین تعداد کردن میکروارگانیسم ها (مانند CMV)، شناسایی یک ژن بیماریزا (مانند ژن های وروتوکسین) و ژن ها یا جهش های مرتبط با مقاومت دارویی (مانند ژن mecA یا جهش های ژن rpoB) توالی هدف پرایمر باید اختصاصی باشد. به علاوه پرایمر PCR باید قادر به شناسایی با بازده بالا و نیز اختصاصی توالی هدف در نمونه مورد نظر باشد (Espy et al., 2006). یک جستجو به منظور بررسی توالی پرایمر در یکی از پایگاه های اطلاعاتی DNA ازجمله پایگاه NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) نشان

دهنده واکنش های متقاطع می باشد. این در حالی است که تاکنون پایگاه های اطلاعاتی DNA در دسترس فقط بخش کوچکی از توالی های نوکلئیک اسید میکروب ها را در مخلوط نمونه ها از جمله نمونه های کلینیکی را دارند و برای تایید فقدان واکنش متقاطع، مخلوط نمونه ها یا میکروب ها نیز باید مورد بررسی قرار گیرند. به منظور شناسایی و تعیین تعداد، توالی نوکلئیک اسید هدف نیز بایستی در میکروارگانیسم محافظت شده باشد. اگر اطلاعات توالی ناحیه هدف دارای پلی مورفیسم باشد، یک توالی محافظت شده دیگر، باید مورد بررسی قرار گیرد.

طراحی پرایمر و پروب

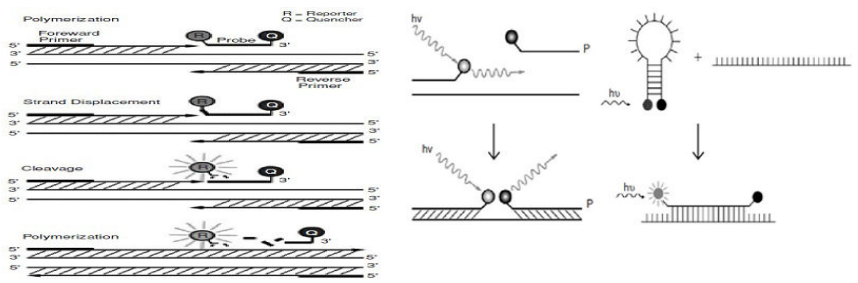
پرایمرهای PCR اولین سطح اختصاصیت روش PCR هستند و پرایمرهایی که تنها یک محصول را تکثیر می کنند بالاترین حساسیت را به وجود می آورند. به علاوه real-time PCR دارای یک پروب تشخیصی هم جنس با اختصاصیت بالا است. دمای اتصال پروب می تواند چند درجه بالاتر از دمای اتصال پرایمر باشد. پرایمرهای PCR بایستی دارای حداقل پتانسیل تشکیل ساختارهای ثانویه مانند هیبرید های درونی یا هیبریدهای متقاطع با دیگر الیگونوکلئوتیدها در PCR باشند. موضوع دیگری که باید مد نظر قرار گیرد اینکه، افزودن یک الیگونوکلئوتید دیگر تحت عنوان پروب نیز مستلزم رعایت شرایط فوق و بررسی عدم تشکیل ساختارهای درون مولکولی و بین مولکولی مضر در واکنش می باشد (Hyndman and Mitsuhashi, 2003; Uhl et al., 2004).

بهینه سازی روش

بهینه سازی شرایط واکنش برای PCR معمولی بسیار چالش برانگیز است. به دلیل مراحل متنوع و نیاز به زمان در PCR معمولی، تعیین پارامترهای مختلف تست، یک فرایند پر زحمت می باشد. برای مثال، برای ارزیابی تاثیر یک پارامتر (برای مثال غلظت بهینه منیزیم) در نتیجه واکنش به چند روز کار تکراری نیاز می باشد. از آنجا که real-time PCR نسبت به PCR معمولی، خودکارتر و سریع تر می باشد، بهینه سازی واکنش به جای چند روز در چند ساعت انجام می شود(Hyndman and Mitsuhashi, 2003; Uhl et al., 2004; Anonymous, 2000; Knutsson et al., 2002; Templeton et al., 2004). به منظور دستیابی به بهترین نتایج در real-time PCR چند ماده کلیدی باید بهینه شوند. این فاکتورها عبارتند از: غلظت منیزیم که به آنزیم پلی مراز اجازه می دهد تا در سطح بهینه عمل کند، غلظت های پرایمر و پروب که به ترتیب حساسیت و اختصاصیت روش را تحت تاثیر قرار می دهند و استفاده از افزودنی ها از جمله دی متیل سولفوکسید که می تواند به واسرشت شده قطعات نوکلئیک اسید با درصد بالای G+C کمک کند. نوع آنزیم پلی مراز مورد استفاده می تواند نقش مهمی داشته باشد و پلی مراز های hot-start ارجح تر می باشند. این آنزیم ها تا رسیدن به حداکثر دمای بحرانی غیرفعال می باشند که این امر باعث کاهش تولید قطعات غیراختصاصی می شود.

جدول ۱- مقایسه و کاربرد ٤ تکنیک مختلف FRET در real-time PCR

FRET	کاربرد	برتری ها	معایب	سایر ملاحظات	مثال
رنگ های متصل شونده به DNA (SYBR Green)	اندازه گیری کیفی و کمی	*حساسیت *سادگی طراحی و یهینه سازی *ارزان بودن *سازگار با پلی مورفیسم های درونی آمپلیکون	اندازه گیری سیگنال بدون آنالیز دمای ذوب فاقد اختصاصیت است.	آنالیز دمای ذوب	شناسایی کیفی و کمی باکتری ها و ویروس ها. شناسایی ژن های مقاومت باکتری ها مانند: *vanA mecA* و *vanB*.
پروب TaqMan	اندازه گیری کیفی و کمی	*بسیار اختصاصی برای توالی هدف *بسیار عالی برای بررسی تعیین تعداد ویروس	پلی مورفیسم ها را نمی تواند در توالی هدف تحمل کند.	انتخاب توالی های غیر پلی موف.	تعیین تعداد ویروس هایی که برای تجویز دارو نیاز به بررسی تعداد ویروس دارند.
پروب های هیبرید شونده دوتایی	اندازه گیری کیفی و کمی همراه با آنالیز جهش ها	*بسیار اختصاصی برای توالی هدف *مفید برای آنالیز جهش ها *مولتی پلکسینگ	اندازه آمپلیکون باید به حدی بزرگ باشد که دو پروب دربین آن قرار بگیرد.	انتخاب توالی هدف با جهش های شناخته شده برای آنالیز جهش ها.	بررسی تعداد ویروس ها و جهش های نقطه ای در CMV و HIV.
بیکون های مولکولی	اندازه گیری کیفی و کمی و به ویژه یافتن جهش ها	آنالیز جهش ها، همراه با اندازه گیری کمی و مولتی پلکسینگ آسان می گردد.	مکان جهش ها در توالی هدف باید شناخته شده باشد.	انتخاب توالی هدف با دانستن مکان جهش هاکه توسط قسمت حلقه پروب پوشانده می شود.	جهش های مرتبط با مقاومت به ریفامپین در ژن *rpoB* باکتری *M. tuberculosis* و شناسایی واریته های مقاوم به دارو در HBV.



(ج) (ب) (الف)

تصویر ۱- مکانیسم عمل ۳ نوع پروب رایج در real-time PCR. الف) بیکون های مولکولی، ب) پروب هیبرید شونده دوتایی و ج) پروب هیدرولیز شونده

Fluorophore	Replaces	Dye-5'-T_{10} EX	Dye-5'-T_{10} EM	BHQ
BioSearch Blue		352	447	**BHQ-0** λ_{MAX} 493 nm QR 430-520 nm
Acridine		362	462	
Coumarin		432	472	
FAM		495	520	
Rhodamine Green		503	528	
TET		521	536	**BHQ-1** λ_{MAX} 534 nm QR 480-580 nm
CAL Fluor Gold 540	VIC/TET/JOE	522	544	
JOE		529	555	
VIC		538	554	
HEX		535	554	
CAL Fluor Orange 560	VIC/HEX/JOE	538	559	
Quasar 570	Cy3	548	566	
TAMRA		557	583	
Rhodamine Red		560	580	
CAL Fluor Red 590	TAMRA	569	591	**BHQ-2** λ_{MAX} 579 nm QR 560-670 nm
Cy3.5		581	596	
ROX		575	602	
CAL Fluor Red 610	Texas Red	590	610	
CAL Fluor Red 635	LC Red 640	618	637	
Pulsar 650		460	650	**BHQ - 3** λ_{MAX} 672 nm QR 620-730 nm
Quasar 670	Cy5	647	667	
Quasar 705	Cy5.5	690	705	

تصویر ۲- گزارشگرها و خاموش کننده های رایج در real-time PCR.

تشخیص بیماری های عفونی با استفاده از real-time PCR

ابزارهای تشخیص مولکولی و روش های تشخیصی از جمله تکثیر نوکلئیک اسید در آزمایشگاه های میکروبیولوژی بالینی برای تشخیص هرچه بهتر میکروب های بیماریزا به طور فزاینده ای استفاده می شوند (Mackay, 2004 و Lanciotti and Kerst, 20001). همچنین فن آوری های بر پایه نوکلئیک اسید برای بررسی مقاومت دارویی و بررسی های اپیدمیولوژی استفاده می شوند. مبانی real-time PCR در ابتدا برای شناسایی و تکثیر یک ژن خاص یا یک توالی مشخص از میکروارگانیزم ها استفاده شد. اندازه گیری های کمّی تعداد ویروس ها نیز با این روش به سادگی مقدور شد. از محاسن این روش می توان به حساسیت، دقت و سرعت بالای این روش در تشخیص میکروب های بیماریزا بدون توجه به خصوصیات فنوتیپی یا قابلیت بقا بعد از درمان آنتی بیوتیکی اشاره نمود. اهمیت بالینی استفاده از تشخیص مولکولی عوامل بیماریزا را می توان در موارد زیر برشمرد: ۱) بیماریزاهایی که سخت رشد یا کند رشد و غیر قابل رشد در محیط آزمایشگاهی می باشند از جمله: *مایکوباکتریوم*، *لژیونلا*، *بارتونلا*، *لپتوسپیرا*، *بورلیا*، *بوردتلا*، *مایکوپلاسما* و *تروفریما ویپلی* که ممکن است نیاز به روزها یا هفته ها گرمخانه گذاری در شرایط ویژه باشند؛ ۲) ارگانیزم های درون سلولی اجباری مانند: *کلامیدیا*، *ریکتسیا*، *کوکسیلا*، *ارلیشیا*، ویروس های DNA یا RNA دار؛ ۳) در طول درمان آنتی بیوتیکی؛ ٤) تعیین هویت فنوتیپی بیوشیمیایی ناکارآمد؛ ۵) تعیین زمان توقف اضافی برای مقاومت دارویی؛ ٦) تشخیص سریع برای افراد بستری در تخت (Sloan et al., 2004; Makinen et al., 2001; Huletsky et al., 2004; Piatek et al., 1998).

نتیجه گیری

امروزه تشخیص بسیاری از عوامل عفونی در آزمایشگاه های تشخیصی بر پایه کشت و روش های سرولوژی می باشد. این روش ها زمان بر و به طور قابل ملاحظه ای وابسته به شرایط آزمایشگاهی و موضوع مورد بررسی بوده و همیشه قابل تکرار نیستند. روش های تشخیص مولکولی غالبا سریع و قابل اطمینان برای آزمایش های تشخیصی هستند. به علاوه روش های مولکولی می توانند به طور مستقیم بر روی نمونه بافت های دریافت شده از بافت های جانداران بدون نیاز به کشت میکروارگانیسم ها به کار برده شوند. روش های مولکولی وابسته به چگالی، زیست پذیری و سرعت رشد میکروارگانیسم ها نبوده و نتایج آنها بسیار قابل اعتماد و قابل تکرارتر از نتایج روش های فنوتیپی بر پایه کشت و سرولوژی هستند. کاربرد وسیع real-time PCR در تشخیص، تعیین مقاومت دارویی، تعیین ژنوتیپ، بررسی جهش ها، بررسی های کمّی و تعیین میزان بیان ژن ها، آن را به تکنیکی قدرتمند و بی مانند تبدیل کرده است. از اینرو به نظر می رسد که آموزش و بومی سازی تکنیک های تشخیصی بر پایه real-time PCR، با توجه به مزایای فوق الذکر مستلزم توجه بیشتر و نیازمند آموزش همگانی برای کسانی است که در راستای تشخیص و پژوهش در زمینه رشته های پزشکی، دامپزشکی و کلیه رشته های مرتبط با علوم زیستی فعالیت دارند می باشد.

References

1. Abravaya, K., Huff, J., Marshall, R., Merchant, B., Mullen, C., Schneider, G., and Robinson, J. 2003. Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications. Clin Chem Lab Med, 41: 468-474.
2. Anonymous. 2000. Technical note LC 9/2000. Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN.
3. Bernard, P.S., Ajioka, R.S., Kushner, J.P., and Wittwer, C.T. 1998. Homogeneous multiplex genotyping of hemochromatosis mutations with fluorescent hybridization probes. Am J Pathol, 153: 1055-1061.
4. Boeckh, M., Huang, M., Ferrenberg, J., Stevens-Ayers, T., Stensland, L., Nichols, W.G., and Corey, L. 2004. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. J. Clin. Microbiol. 42: 1142-1148.
5. Bustamante, L.Y., Crooke, A., Martinez, J., Diez, A., and Bautista, J.M. 2004. Dual-function stem molecular beacons to assessmRNAexpression inAT-rich transcripts of Plasmodium falciparum. Biotechniques, 36: 488-942, 494.
6. Chen, X., Zehnbauer, B., Gnirke, A., & Kwok, P.Y. 1997. Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method. Proc Natl Acad Sci U S A, 94: 10756–61.
7. Elnifro, E.M., Ashshi, A.M., Cooper, R.J., and Klapper, P.E. 2000. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. Clin Microbiol Rev, 13: 559-570.
8. Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D.C., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill III, F.R., and Smith, T.F. 2006. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clin Microbiol Rev, 19: 165-256.
9. Gulliksen, A., Solli, L., Karlsen, F., Rogne, H., Hovig, E., Nordstrom, T., and Sirevag, R. 2004. Real-time nucleic acid sequence-based amplification in nanoliter volumes. Anal Chem, 76: 9-14.
10. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: realtime monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology, 11: 1026-30.
11. Hiyoshi, M., and Hosoi, S. 1994. Assay of DNA denaturation by polymerase chain reactiondriven fluorescent label incorporation and fluorescence resonance energy transfer. Anal Biochem, 221: 306-311.
12. Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., and Gelfand, D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A, 88: 7276–80.
13. Huletsky, A., Giroux, R., Rossbach, V., Gagnon, M., Vaillancourt, M., Bernier, M., Gagnon, F., Truchon, K., Bastien, M., Picard, F.J., van Belkum, A., Ouellette, M., Roy, P.H., and Bergeron, M.G. 2004. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillinresistant Staphylococcus aureus directly from specimens containing a mixture of staphylococci. J Clin Microbiol, 42: 1875-1884.
14. Hyndman, D.L., and Mitsuhashi, M. 2003. PCR primer design, p. 81–88. In

J. M. S. Bartlett and D. Stirling (ed.), Methods in molecular biology, PCR protocols, 2nd ed. Humana Press, Totowa, N.J. p:????

15. Knutsson, R., Lo¨fstrom, C., Grage, H., Hoorfar, J., and Radstro¨m, P. 2002. Modeling of 5' nuclease real-time responses for optimization of a highthroughput enrichment PCR procedure for Salmonella enterica. J. Clin. Microbiol. 40: 52-60.
16. Lanciotti, R.S., and Kerst, A.J. 2001. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection ofWest Nile and St. Louis encephalitis viruses. J Clin Microbiol, 39: 4506-4513.
17. Lee, L.G., Connell, C.R., and Bloch, W. 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. Nucleic Acids Res, 21: 3761-6.
18. Lee, L.G., Livak, K.J., Mullah, B., Graham, R.J., Vinayak, R.S., and Woudenberg, T.M. 1999. Seven-color, homogeneous detection of six PCR products. Biotechniques, 27: 342-349.
19. Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti,W., and Deetz, K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. PCR Methods Appl, 4: 357-362.
20. Mackay, I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect, 10: 190-212.
21. Makinen, J., Viljanen, M.K., Mertsola, J., Arvilommi, H., and He, Q. 2001. Rapid identification of Bordetella pertussis pertactin gene variants using LightCycler real-time polymerase chain reaction combined with melting curve analysis and gel electrophoresis. Emerg Infect Dis, 7: 952-958.
22. Morrison, T.B., Weis, J.J., and Wittwer, C.T. 1998. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. Biotechniques, 24: 954-958, 960, 962.
23. McKillip, J.L., and Drake, M. 2000. Molecular beacon polymerase chain reaction detection of Escherichia coli O157:H7 in milk. J Food Prot, 63: 855-859.
24. Nissen, M.D., and Sloots, T.P. 2002. Rapid diagnosis in pediatric infectious diseases: the past, the present and the future. Pediatr Infect Dis J, 21: 605-12.
25. Nitsche, A., Steuer, N., Schmidt, C.A., Landt, O., and Siegert, W. 1999. Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. Clin Chem, 45: 1932–7.
26. Osterman, H.L., and Schutz-Geschwender, A. 2007. Seeing Beyond the Visible With IRDye® Infrared Dyes. LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, USA, P???
27. Piatek, A.S., Tyagi, S., Pol, A.C., Telenti, A., Miller, L.P., Kramer, F.R., and Alland, D. 1998. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Nat Biotechnol, 16: 359-363.
28. Read, S.J., Mitchell, J.L., and Fink, C.G. 2001. LightCycler multiplexPCRfor the laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system. J Clin Microbiol, 39: 3056-3059.
29. Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., and Wittwer, C.T. 1997. Product

differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem, 245: 154-160.

30. Sloan, L.M., Uhl, J.R.,Vetter, E.A., Schleck, C.D., Harmsen, W.S., Manahan, J., Thompson, R.L., Rosenblatt, J.E., and Cockerill, F.R. 3rd. 2004. Comparison of the Roche Light-Cycler vanA/vanB detection assay and culture for detection of vancomycin-resistant enterococci from perianal swabs. J Clin Microbiol, 42: 2636-2643.
31. Szuhai, K., Sandhaus, E., Kolkman-Uljee, S.M., Lemaitre, M., Truffert, J.C., Dirks, R.W., Tanke, H.J., Fleuren, G.J., Schuuring, E., and Raap, A.K. 2001. A novel strategy forhuman papillomavirus detection and genotyping with SybrGreen and molecular beacon polymerase chain reaction. Am J Pathol, 159: 1651-1660.
32. Tang, Y.W., and Stratton C.W. 2006. Advanced techniques in diagnostic microbiology. 1st ed. Qin X. Springer Science+Business Media. New York P:????
33. Templeton, K.E., Scheltinga, S.A., Beersma, M.F., Kroes, A.C., and Claas, E.C. 2004. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. J. Clin. Microbiol. 42: 1564-1569.
34. Uhl, J.R., and Cockerill, F.R.I. 2004. The fluorescence resonance energy transfer system, p. 295-306. In D. H. Persing, F. C. Tenover, J. Versalovic, Y. W. Tang, E. R. Unger, D. A. Relman, and T. J. White (eds.), Molecular microbiology diagnostic principles and practice. ASM Press, Washington, D.C.
35. Vet, J.A., Majithia, A.R., Marras, S.A., Tyagi, S., Dube, S., Poiesz, B.J., and Kramer, F.R. 1999. Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using molecular beacons. Proc Natl Acad Sci U S A, 96: 6394–9.
36. Vet, J.A., and Marras, S.A. 2005. Design and optimization of molecular beacon real-time polymerase chain reaction assays. Methods Mol Biol, 288: 273-290.
37. Wittwer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Gundry, R.A., and Balis, U.J. 1997. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques, 22: 176-181.

سال چهارم/شماره۱۴/ زمستان۹۱/ صفحات۴۱تا۵۲