پژوهنده (مجله پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی)
سال بیستم، شماره ۲، پی در پی ۱۰۴، صفحات ۱۰۴ تا ۱۱۱
خرداد و تیر ۱۳۹۴

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱۱/۱۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۳/۲۴

طراحی کنترل داخلی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز باکتری مایکوپلاسما به روش رقابتی

تمنا نفریه[۱]، الهام مسلمی[۲،۳]، محمدرضا ذوالفقاری[۱]، محمدحسن شاه حسینی[۲،۴]*

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۲. مؤسسه ایرانیان ژن فناور (IGF)، تهران، ایران
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران
۴. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مایکوپلاسماها مهمترین و جدی‌ترین آلوده‌کننده‌های فرآورده‌های بیولوژیک تولیدی در کشت‌های سلولی می‌باشند. تکنیک PCR جهت شناسایی سریع جنس مایکوپلاسما، از اولویت بالایی برخوردار است. اما یکی از معایب این روش، نداشتن کنترل داخلی است. هدف اصلی این مطالعه، استاندارد کردن تست PCR تشخیص جنس مایکوپلاسما از طریق ساخت کنترل داخلی به روش رقابتی است.

مواد و روش‌ها: با استفاده از پرایمرهای ویژه‌ی هدف 16S rRNA، تست PCR جهت تشخیص مولکولی جنس مایکوپلاسما بهینه شد. پرایمرهای مرکب (Composite Primer) برای کنترل داخلی با استفاده از پرایمرهای ژن کینتوپلاست انگل لیشمانیا طراحی و سپس قطعه‌ی کنترل داخلی تکثیر گردید. هر دو محصول هدف و کنترل داخلی بعد از خالص‌سازی به پلاسمید PTZ57 R اتصال و سپس در باکتری اشرشیا کلی JM107 ترانسفورم و نهایتاً کلون گردید.

یافته‌ها: اندازه‌ی محصول تشخیصی و کنترل داخلی به ترتیب 272bp و 672bp بود، که از نظر اندازه، اختلاف مطلوبی با هم داشتند. تعداد حداقل کنترل داخلی در هر واکنش، ۱۰۰۰ عدد تعیین شد. حساسیت تست PCR برای تشخیص جنس مایکوپلاسما، ۱۰ باکتری به دست آمد. در تست ویژگی با عوامل مختلف، هیچ محصول ناخواسته‌ای مشاهده نشد. طیفی که در آن تکثیر کنترل داخلی مشاهده شد، بین صد تا ده میلیون باکتری بدست آمد.

نتیجه‌گیری: در کنار سرعت و دقت بالای تکنیک PCR، نتایج منفی و مثبت کاذب که به دلیل وجود مهارکننده‌های واکنش PCR رخ می‌دهند، می‌تواند کارایی این روش را کاهش دهد. استفاده از یک DNA دیگر به عنوان کنترل داخلی می‌تواند این خطاها را شناسایی کند.

واژگان کلیدی: جنس مایکوپلاسما، کنترل داخلی تکثیری، PCR ، طراحی، ساخت

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:
Nafariyeh T, Moslemi E, Zolfaghari MR, Shahhosseiny MH. Designing of Mycoplasma spp chain reaction polymerase's internal control by PCR cloning. Pejouhandeh 2015;20(2):104-111.

مقدمه

مایکوپلاسماها ارگانیسم‌های بدون دیواره با قطری حدود ۲۰۰ تا ۵۰۰ نانومتر و توانا در خودتکثیری هستند. غشای آنها شباهت زیادی به غشای سلول‌های پستانداران دارد. آنها قادرند از فیلترهای میلی‌پور عبور کرده و از این طریق باعث آلودگی شوند. در واقع، مایکوپلاسماها مهمترین و جدی‌ترین آلوده‌کننده‌های کشت سلول، فرآورده‌های بیولوژیک و بیوتکنولوژیک تولیدی در کشت‌های سلولی و مخرب نتایج آزمون‌های بیولوژیک و تست‌های تشخیصی هستند که در کشت سلولی انجام می‌شود. بنابراین، تشخیص سریع آنها در کشت‌های سلولی، به خصوص در تولید فرآورده‌های بیولوژیک و نوترکیب دارای اهمیت فوق‌العاده بالایی است (۱). روش‌های شناسایی مایکوپلاسما شامل روش‌های بیوشیمیایی مانند آدنوزین فسفوریلاز که فاقد ویژگی‌اند، روش‌های بر پایه‌ی

*نویسنده مسؤول مکاتبات: محمدحسن شاه حسینی؛ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی؛ مؤسسه ایرانیان ژن‌فناور (IGF)، تهران، ایران؛ تلفن: ۰۹۱۲۳۳۰۴۰۶۹؛ پست الکترونیک: shahhosseiny@yahoo.com

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-07-01]

رنگ‌آمیزی و دو رگه‌سازی کـه دارای حساسـیت کـم و نوعاً ویژگی پایین هسـتند و واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز یـا PCR می‌باشد (۲). روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک ماننـد PCR، بـه دلیل داشتن حساسیت، ویژگی و دقت بیشتر، جزو روش‌هـایی مناسب جهت تشخیص طیف وسیعی از عوامـل آلـوده‌کننـده، خصوصاً مایکوپلاسماها هستند که در دهـه‌ی اخیـر توسـعه‌ی فراوانی یافته است (۵-۳). با این حال، میـزان حساسـیت ایـن تکنیک تا حـد زیـادی بـه: ۱) روش اسـتخراج DNA، ۲) ژن هـدف، ۳) پرایمرهـای طراحـی شـده، ۴) روش شناسـایی محصول، ۵) نوع نمونـه و بسـیاری فاکتورهـای دیگـر بسـتگی دارد. پرایمرهای طراحی شده عموماً جهت بخش‌های مشـترک ژن 16S rRNA یـا بخـش‌هـای 16S-23S rRNA و یـا هدف‌های دیگر طراحی شده است (۶). توالی ژن‌هـای rRNA تعداد زیادی از گونـه‌هـای مایکوپلاسـما، تعیـین تـرادف شـده است. مطالعات فیلوژنتیک و سیستماتیک ایـن ارگانیسـم‌هـا و همین‌طور بررسی‌های کامپیوتری مقایسه‌ای ایـن تـرادف‌هـای ریبوزومی، مؤید بخش‌های به شدت ثابت و مشترک در همه‌ی انواع مایکوپلاسمایی است که جهت طراحی پرایمرهـای PCR مناسب به کار می‌روند. تکنیک تشخیصی مولکـولی PCR، نـه تنها سریع و با قابلیت تکرار بالا، بلکه تکنیکی بـا حساسـیت و ویژگی زیاد جهت شناسایی مایکوپلاسماها می‌باشد (۱). PCR علاوه بر تمام مزیت‌هایش، دارای مشکلاتی نیز می‌باشـد. یکـی از این مشکلات، مسأله‌ی آلودگی اسـت. بـه دلیـل حساسـیت فوق‌العاده و قدرت تکثیر زیاد PCR، هر قطعه DNA خـارجی که وارد محیط PCR می‌شود، مورد تکثیر قرار گرفته و ممکن است نتایج غیـر واقعـی بـه وجـود آورد. حساسـیت ایـن روش ایجاب می‌کند که ملاحظات شدیدی اعمال گـردد تـا بـه ایـن وسیله از تکثیر آلوده‌کننده‌هایی مانند DNAهای تکثیـر شـده از آزمـایش‌هـای قبلـی جلـوگیری بـه عمـل آیـد. گـاهی نیـز باقی‌مانده‌ی قطعات DNA حاصل از تکثیر DNAهـای قبلـی باعث آلودگی PCR می‌شود که در این مورد شستشوی زیاد و دقیق، مشکل‌گشا است. ولی با تمام نکات گفته شده فوق برای جلـوگیری از اشـتباهات احتمـالی در PCR، همـواره بایـد کنترل‌های مثبت و منفی در هـر سـری از آزمـایش‌هـا وجـود داشته باشند (۷). یکی از مهمتـرین مسـایل در مقـالات چـاپ شده در زمینه‌ی تشخیص PCR جنس مایکوپلاسما، نداشـتن کنترل داخلی در بیشتر این مقالات اسـت. بـر خـلاف کنتـرل مثبت، کنترل داخلی عموماً یک توالی DNA غیر هدف حاضر در نمونه است کـه بـه طـور همزمـان بـا تـوالی هـدف تکثیـر می‌گردد. در یک PCR بدون کنترل داخلی، یک پاسـخ منفـی یعنی عدم حضور توالی هدف، می‌تواند در عـین حـال بـه ایـن معنا باشد که واکـنش بـه دلایلـی ماننـد اخـتلال در دسـتگاه ترموسـایکلر، مخلـوط PCR نادرسـت، فعالیـت آنـزیم DNA پلیمراز، یا حداقل حضور مـواد بازدارنـده در مـاتریکس نمونـه، ممانعت شده باشد. برعکس، در یک PCR بـا کنتـرل داخلـی، یک سیگنال کنترل همیشه تولید می‌گردد که نشـان‌دهنـده‌ی تکثیر کنترل داخلی می‌باشد. این کنترل داخلی حتی در عـدم حضور توالی هدف مورد آزمایش، تکثیر می‌گردد و اگـر تکثیـر نشود به دلایل مختلف، اشکالی در پروسه‌ی تکثیر وجود داشته است (۸).

دو استراتژی کلـی شـامل کنتـرل داخلـی رقـابتی و کنتـرل داخلی غیر رقابتی برای ساخت کنترل داخلـی وجـود دارد. بـا استفاده از تکنیک پرایمر مرکب، هدف و کنترل داخلی با یـک جفت پرایمر، در همان شرایط (شرایط یکسان) و درهمان لوله (در یک لوله) تکثیر می‌شوند. در این استراتژی، همیشه رقابت بین DNA هدف و کنترل داخلی وجود دارد. لذا میزان کنترل داخلی جهت حد شناسایی (Detection limit)، یـک نکتـه‌ی حساس و مهم می‌باشد. در استراتژی غیر رقـابتی، پرایمرهـای هدف و اینترنال کنترل متفاوتند. این استراتژی، مسـتلزم یـک تست PCR با دو واکنش متفاوت است کـه بـه طـور همزمـان بایستی جلو روند. وقتی هدف و کنتـرل داخلـی در ایـن روش تکثیـر شـوند، نتـایج معتبـر اسـت. از معایـب روش تکثیـر غیررقابتی، این است که این روش نوعاً به طـور دقیـق، تکثیـر هدف اولیـه ناشـی از تفـاوت در تـرادف پرایمرهـا را مـنعکس نمی‌نماید. عیب دوم آن است که کاربرد کنترل داخلی در فـرم غیر رقابتی نیازمند توسعه دو PCR و بهینه کردن آنها در یک شرایط PCR است که می‌تواند باعث کاهش کار یـک تکثیـر و یا هر دو هدف و کنترل داخلی گردد (۱۲-۹).

هدف مطالعـه‌ی حاضـر، طراحـی و سـاخت کنتـرل داخلـی تکثیری تست PCR تشخیصی جـنس مایکوپلاسـما بـه روش رقابتی و از طریق PCR-Cloning است.

مواد و روش‌ها

استخراج DNA از مایکوپلاسما. تست PCR با اسـتفاده از DNA اسـتخراج شـده از روش Boiling از گونـه‌هـای مایکوپلاسـما پنومونیـه، مایکوپلاسـما اورال و مایکوپلاسـما آرجنینی تهیه شـده از مؤسسـه رازی بهینـه گردیـد. مراحـل اسـتخراج بـه ایـن ترتیـب بـود: ۱) یـک میلـی‌لیتـر از کشـت مایکوپلاسما به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقـل شـد. بعد از سانتریفوژ بـه مـدت ۵ دقیقـه در ۸۰۰۰ دور در دقیقـه،

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-07-01]

رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل، حل و به آن ۵۰ میکرولیتر روغن معدنی اضافه گردید. ۲) میکروتیوب حاوی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. ۳) سپس میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. ۴) به کمک سمپلر، فاز میانی (مایع زیر روغن و روی رسوب حاصل) جدا شده و به یک میکروتیوب جدید منتقل گردید.

پرایمرها و شرایط PCR. بهینه نمودن تست PCR برای تشخیص جنس مایکوپلاسما، از طریق بهینه نمودن غلظت اجزایی که در واکنش PCR به‌کار می‌روند و همچنین طراحی و انتخاب برنامه‌ی حرارتی مناسب در دستگاه ترموسایکلر انجام گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، در جدول یک آمده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص DNA جنس مایکوپلاسما و تکثیر کنترل داخلی.

MSPF	5'-GGG-AGC-AAA-CAG-GAT-TAG-ATA-CCC-T-3'
MSPR	5'-TGC-ACC-ATC-TGT-CAC-TCT-GTT-AAC-CT-C-3'
ICFMSPP	5'-GGG-AGC-AAA-CAG-GAT-TAG-ATA-CCC-TTC-GCA-GAA-CGC-CCC-TAC-C-3'
ICRMSPP	5'-TGC-ACC-ATC-TGT-CAC-TCT-GTT-AAC-CTC-AGG-GGT-TGG-TGT-AAA-ATA-GGC-3'

برای انجام واکنش PCR با استفاده از لوله‌های ۲۰۰ میکرولیتری و با حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر، به ترتیب زیر عمل گردید: ۲ نانوگرم از DNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی مخصوص جنس مایکوپلاسما با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومولار، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$) از غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰میلی‌مولار) و ۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (بیوفلوکس)، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تکثیر یافت. چرخه‌های حرارتی شامل ۲ دقیقه ابتدایی با حرارت ۹۴ درجه جهت باز شدن دو رشته‌ی DNA از هم و سپس ۴۰ سیکل متوالی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۷۰ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه، انجام شد.

روش شناسایی محصول. پس از به پایان رسیدن سیکل‌های حرارتی، برای مشاهده‌ی DNA تکثیر شده، از تکنیک الکتروفورز و ژل آگاروز استفاده شد. محصول PCR در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی، روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد و با استفاده از سایبرگرین و نور UV روی دستگاه ژل داکومنتیشن، بررسی گردید.

حساسیت و ویژگی. در این تحقیق، به منظور تعیین حساسیت تست بهینه شده، یک نمونه DNA که بر اساس فرمول Genome Copy Number و جذب در nm ۲۶۰، تعداد کپی DNAی مایکوپلاسما در آن مشخص شده بود، آماده گردید و سپس به صورت سریال، رقیق شد. تعیین حساسیت تست PCR بهینه شده با استفاده از تهیه رقت‌های مختلف DNA از Mycoplasma spp صورت گرفت که از یک تا یک میلیون DNA مایکوپلاسما به ازای هر واکنش بود.

ساخت کنترل داخلی. جهت ساخت کنترل داخلی رقابتی به روش PCR-Cloning، پرایمرهای جلویی و عقبی PCR جنس مایکوپلاسما در بخش '۵ پرایمرهای ژن کینتوپلاست لیشمانیا با اندازه‌ی محصول ۶۲۰ جفت باز، به صورت دم (Tail) طراحی و سنتز شد (جدول ۱). برای انجام واکنش PCR جهت تکثیر قطعه‌ی کنترل داخلی، ۲ نانوگرم DNA استخراج شده‌ی لیشمانیا با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی کنترل داخلی با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومول، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$) از غلظت ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰میلی‌مولار) و ۲ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، تکثیر یافت. چرخه‌های حرارتی از ۴۰ سیکل متوالی شامل ۹۳ درجه سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و یک سیکل پلیمریزاسیون نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، تشکیل شده بود. پس از به پایان رسیدن سیکل‌های حرارتی، برای مشاهده‌ی DNA تکثیر شده، از تکنیک الکتروفورز استفاده شد.

کلونینگ محصول PCR و کنترل داخلی. قطعات حاصل (محصول PCR و کنترل داخلی) بعد از خالص سازی با پلاسمید pTZ57R کمپانی فرمنتاس به مدت یک ساعت در ۲۲ درجه سانتی‌گراد اتصال و سپس در باکتری اشریشیا کلی JM107 ترانسفورم و کانستراکت حاصل از طریق Blue/White Screening در محیط حاوی آمپی‌سیلین، X-GAL و IPTG انتخاب گردید. با استفاده از کیت T/A cloning کمپانی Thermo Scientific، هر دو آمپلیکون در

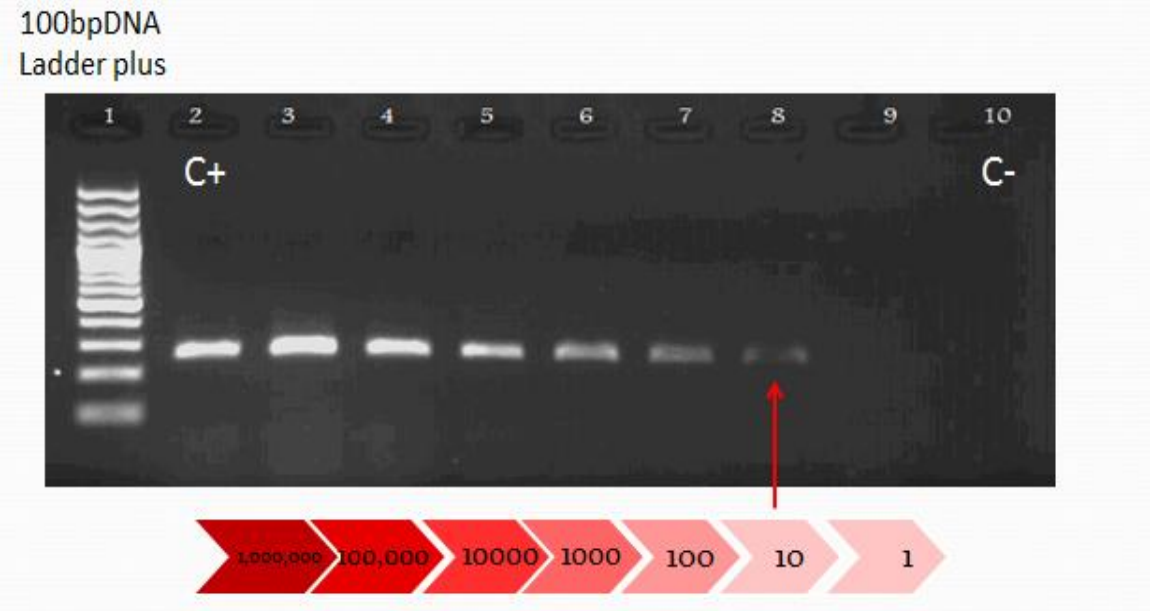
[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-07-01]

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 کنترل داخلی با استفاده از پرایمرهای تشخیصی، تأیید گردید.

تعیین غلظت ایده‌آل کنترل داخلی. هدف از تعریف غلظت DNA ایده‌آل کنترل داخلی برای PCR، تأیید غلظت متناسب کنترل داخلی است که با هدف، کمترین رقابت در تکثیر را انجام دهد. جهت به دست آوردن غلظت بهینه، غلظت‌های متفاوت پلاسمید حاوی کنترل داخلی و DNAی جنس مایکوپلاسمای استاندارد، مورد آزمایش قرار گرفت. غلظت DNA جنس مایکوپلاسمای مورد استفاده در تست و همچنین کنترل داخلی، به وسیله‌ی اسپکتروفتومتر در A260 تعیین شد. رقت‌های حاوی مقادیر DNAی متفاوت عامل که از طریق serial dilution تهیه شده بود، با مقادیر ثابت کنترل داخلی، تست گردید. برای PCR، ۲ نانوگرم از DNAی عامل با یک میکرولیتر از کنترل داخلی، مخلوط و در میکس PCR استفاده گردید.

یافته‌ها

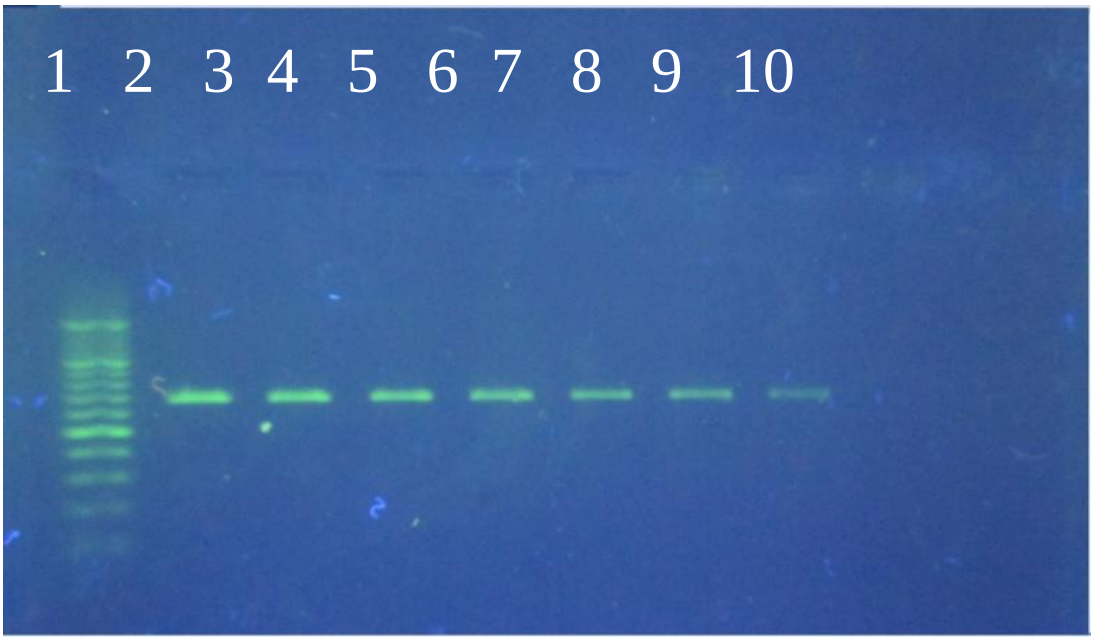
تست PCR روی DNA استخراج شده از نمونه با تیتر مشخص، بهینه گردید. در آزمون ویژگی، هیچ محصول ناخواسته‌ای با DNA موش (Mouse)، انسان (Human)، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، هموفیلوس آنفولانزا (*H. infulenza*)، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberculosis*)، ساکارومیسس سرویزیه (*Saccharomyces cervisiae*) و اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) مشاهده نشد. از طریق تهیه‌ی رقت‌های سری از DNA استخراج شده‌ی باکتری و انجام تست PCR، حد تشخیص (حساسیت) در حد ۱۰ کپی (۱۰ باکتری) در نمونه‌ی مورد آزمایش به‌دست آمد (شکل ۱).



شکل ۱. حساسیت تست تشخیص PCR جنس مایکوپلاسما. لاین ۱: سایز مارکر 100 bp DNA Ladder plus، لاین ۲: کنترل مثبت، لاین ۳ الی ۹: به ترتیب DNA یک میلیون، صد هزار، ده هزار، هزار، صد، ده و یک مایکوپلاسما به ازای هر واکنش، لاین ۱۰: کنترل منفی.

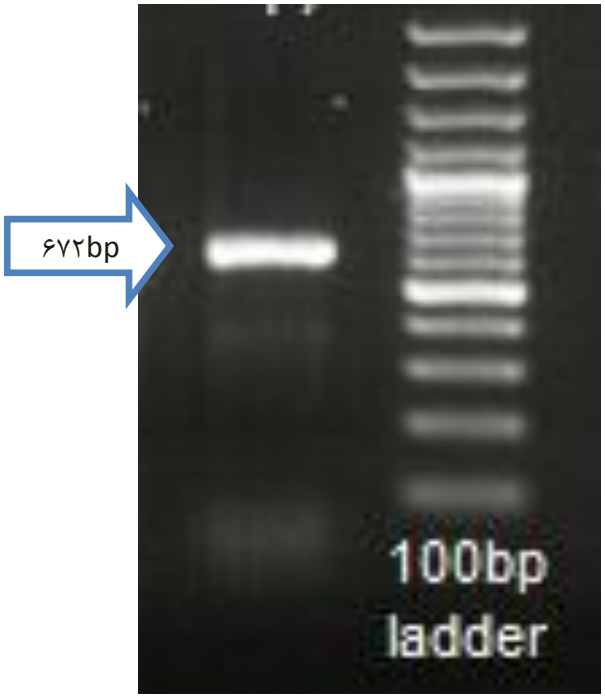
قطعه‌ی کنترل داخلی بعد از آمپلیفیکاسیون، کلون و توسط روش PCR تأیید گردید. در شکل ۲، محصول تکثیر شده‌ی کنترل داخلی با اندازه‌ی ۶۷۲ bp در کنار سایز مارکر 100 bp DNA Ladder Plus مشاهده می‌گردد. تعداد پلاسمید مناسب جهت اضافه کردن در یک تست PCR تشخیصی، حدود ۱۰۰۰ عدد به دست آمد (شکل ۳). برای استاندارد کردن کنترل داخلی، غلظت به‌کار رفته‌ی آن (تعداد) اهمیت فوق العاده بالایی دارد، چرا که حضور مقادیر بالای کنترل داخلی، موجب رقابت با الگوی DNA ژنومیک شده و بنابراین نتیجه‌ی منفی کاذب ایجاد می‌شود. لذا کاربست تعداد معادل ۱۰۰۰ پلاسمید حاوی کنترل داخلی با ۲ نانوگرم از DNAی نمونه‌ی استخراج شده، موجب کمترین اثرات رقابتی گردید.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-07-01]



شکل ۳. نتایج PCR کنترل داخلی. لاین ۱: سایز مارکر (Thermo scientific) 100 bp DNA Ladder، لاین ۲: PCR با الگوی یک میلیون پلاسمید، لاین ۳: PCR با الگوی صد هزار پلاسمید، لاین ۴: PCR با الگوی ده هزار پلاسمید، لاین ۵: PCR با الگوی هزار پلاسمید، لاین ۶: PCR با الگوی ۱۰۰ پلاسمید، لاین ۷: PCR با الگوی ۱۰ پلاسمید، لاین ۸: PCR با الگوی یک پلاسمید، لاین ۹: کنترل منفی.

در شکل ۴، نتایج PCR کنترل داخلی و تست آن با مقادیر کم (۱۰۰ عدد) و مقادیر بالا (یک میلیون عدد DNAی مایکوپلاسما) مشاهده می‌شود.

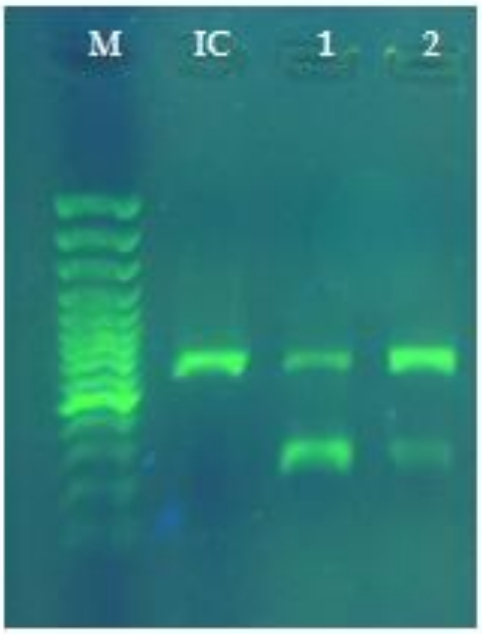


شکل ۲. کنترل داخلی کلون و تکثیر شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

بحث

مایکوپلاسماها ارگانیسم‌هایی غیر قابل رویت با میکروسکپ‌های نوری و مهمترین عوامل آلوده‌کننده‌ی کشت‌های سلولی هستند. این عوامل آلوده‌کننده‌ی پنهان، به طرق مختلفی همچون شناسایی تغییر رنگ محیط‌های کشت، شناسایی آنتی‌ژنهای خاص به وسیله‌ی الایزا، روش‌های بیوشیمیایی، کشت در محیط‌های کشت، رنگ‌آمیزی با رنگ‌های فلوروکروم مانند رنگ هوخست ۳۳۲۵۸ و DAPI و روش‌های مولکولی، قابل شناسایی هستند. آلودگی مایکوپلاسمایی کشت‌های سلولی موجب تغییرات بیوشیمیایی و ژنتیکی و در نتیجه، تفسیر نامناسب نتایج آزمایش‌ها روی کشت‌های سلولی آلوده می‌گردد. بنابراین، جستجوی آلودگی مایکوپلاسمایی به‌طور دوره‌ای در آزمایشگاه‌هایی که با کشت سلول سروکار دارند، بایستی انجام شود (۱۴،۱۳). به کمک تکنیک PCR می‌توان فقط تعداد معدودی از کپی‌های ژنوم

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-07-01]



شکل ۴. نتایج PCR با تعداد مشخص DNA مایکوپلاسما پنومونیه. لاین M: سایز مارکر 100 bp DNA ladder plus فرمنتاس، لاین کنترل داخلی (IC): تکثیر کنترل داخلی به تنهایی، لاین ۱: تست PCR حاوی یک میلیون عدد DNA مایکوپلاسما پنومونیه و ۱۰۰۰ عدد پلاسمید، لاین ۲: تست PCR حاوی ۱۰۰ عدد DNA مایکوپلاسما پنومونیه و ۱۰۰۰ عدد پلاسمید.

مایکوپلاسما را در محیط آزمایشگاه به تعداد زیادی نسخه DNA تکثیر و مشاهده نمود. روش PCR، سریع بوده و نتایج در طول مدت یک روز قابل دسترس خواهند بود (۱۵). با وجود راحتی کار با PCR، سرعت بالا و دقت زیاد، این تکنیک دارای مشکلاتی نیز می‌باشد. مهمترین مشکل مرتبط با استفاده از PCR، آلودگی است که علی‌رغم مراقبت‌های زیاد و فضاسازی مناسب جهت تکنیک‌های تکثیری همچون PCR، باز امکان آلودگی با DNA در سیستم تشخیص مولکولی وجود دارد که در نتیجه باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب می‌گردد. نتایج PCR منفی مایکوپلاسما به طور عمده به دو دلیل به‌وجود می‌آید: ۱) تعداد کم مایکوپلاسما در نمونه و ۲) عدم توزیع مایکوپلاسما، بدین معنی که به بخشی از سلول‌های کشت، مایکوپلاسما چسبیده و بنابراین وقتی که برای اولین بار نمونه تقسیم می‌شود، حضور مایکوپلاسما در برخی لوله‌ها بیشتر خواهد بود. برای برطرف کردن این محدودیت‌ها اقدامات متفاوتی صورت گرفته است که از آن جمله باید به رعایت احتیاط‌های لازم در هنگام جمع‌آوری نمونه‌ها، سازمان‌بندی صحیح محیط کار، آلودگی‌زدایی از مواد و تجهیزات آزمایشگاهی، برطرف کردن آلودگی‌هایی که مربوط به پرسنل آزمایشگاهی است و در نهایت، استفاده از انواع کنترل‌ها (شامل کنترل‌های مثبت، منفی و کنترل‌های داخلی) در هنگام اجرای تست، اشاره نمود (۹). در این تحقیق، هدف طراحی، ساخت و کاربرد کنترل داخلی در تست PCR بوده است. برعکس، در یک PCR که دارای کنترل داخلی است، همیشه یک signal control تولید می‌شود، حتی هنگامی که توالی هدف وجود ندارد، و این امر می‌تواند عدم موفقیت PCR را نمایان کند. با به‌کارگیری کنترل داخلی در تست‌های PCR، نتیجه‌ی تست را به این صورت تفسیر می‌کنیم: نمونه‌هایی که دارای سیگنال هدف هستند، بدون توجه به نتیجه‌ی کنترل داخلی، مثبت تفسیر می‌شوند. نمونه‌هایی که فاقد سیگنال هدف هستند، منفی تلقی می‌شوند، هرچند سیگنال کنترل داخلی آنها قابل ردیابی نباشد. نمونه‌هایی که برای هر دو سیگنال هدف و کنترل داخلی منفی هستند، به عنوان نمونه‌های مخدوش (مهار شده) تفسیر می‌شوند (۱۰).

برای تکثیر هر دو مولکول کنترل داخلی و DNA هدف در روش رقابتی، از یک جفت پرایمر الیگونوکلئوتیدی استفاده می‌شود. بنابراین، تکثیر کنترل داخلی ممکن است به علت رقابت با نمونه‌های دارای مقدار زیاد DNA سرکوب شود. سیگنال کنترل داخلی به طور قابل توجهی با افزایش DNAی هدف، کاهش می‌یابد (۱۷). بنابراین، مهمترین پارامتری که باید توجه شود، غلظت خود کنترل داخلی است. در واقع لازم است کمترین غلظت DNA کنترل داخلی قابل تکثیر، به دقت مشخص و تعیین شود. در غیر این صورت، مقدار زیادی از DNA کنترل داخلی با DNA هدف محصول، رقابت خواهد کرد و سیگنال DNA هدف را از بین خواهد برد. این امر خود باعث نتیجه‌ی منفی کاذب می‌شود. به علاوه، اگر DNA کنترل داخلی در غلظت‌های بالا استفاده شود، کنترل داخلی قادر به شناسایی مهارهای خفیف که باعث ایجاد نتایج کاذب می‌گردد (به خصوص اگر DNA هدف در غلظت‌های بسیار کمی وجود داشته باشد) نخواهد شد. دومین پارامتر اساسی، اندازه یا سایز کنترل داخلی است. در تئوری این طور آمده است که افزایش اندازه هدف نسبت به دیگری، سینتیک واکنش را به سمت محصول PCR کوچکتر پیش می‌برد. قابل ذکر است که سایز کنترل داخلی کمتر از bp ۵۰۰، تأثیری بر دقت PCR ندارد. با وجود این، پیشنهاد شده است که سایز کنترل داخلی باید بزرگتر از توالی هدف باشد تا از رقابتی بودن PCR تا انتهای پروسه، اطمینان حاصل شود. اگر DNA هدف تکثیر پیدا کند ولی کنترل داخلی تکثیر نیابد، فرض بر این است که DNA هدف به میزان بیشتری وجود دارد. در صورت وقوع این امر، نتیجه‌ی مثبت، معتبر است (۱۰).

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-07-01]

در سال ۱۹۹۶ Gibson و همکارانش، یک الگوی کنترل داخلی حاوی سکانس‌های پرایمر یکسان با آمپلیکون mRNA برای cytic fibrosis transmembrane transductance regulator ساختند. اما به منظور ایجاد تمایز، یک تفاوت در سکانس کنترل داخلی به وجود آوردند. یک پروب کنترل داخلی با رنگ گزارشگر فلورسنت در جهت هیبرید شدن با آمپلیکون کنترل داخلی طراحی شد. کنترل داخلی در هر لوله‌ی واکنش، برای آنالیزهای CFTR mRNA استفاده شد. این روش، سهولت و حداکثر کارآمدی را برای Reverse Transcriptase PCR دارا می‌باشد. به عنوان یک قانون کلی یا عمومی، DNA هدف و کنترل داخلی باید از پرایمرهای یکسان استفاده کنند که حاوی مقدار C+G مساوی و یا طول مشابه باشند (۱۶). در سال ۱۹۹۴، دانشمندی به نام Kolk برای تشخیص مولکولی *Mycobacterium tuberculosis* و ساخت IC رقابتی، از قطعه‌ی IS۶۱۱۰ موجود در *M. tuberclosis* استفاده نمود. محصول IC تست این مطالعه ۳۰۱bp و اندازه‌ی محصول هدف ۲۴۵bp بود (۱۷). اما در سال ۲۰۰۰، Jones و همکارانش برای اعتبار بخشیدن به تست PCR تشخیصی سایتومگالوویروس مادرزادی، یک کنترل داخلی با استفاده از باکتریوفاژ لامبدا طراحی کردند. پرایمر مرکب استفاده شده در این تحقیق متشکل از پرایمرهای تکثیری اختصاصی باکتریوفاژ لامبدا و پرایمر تکثیری gB متعلق به سایتومگالوویروس بود. اندازه‌ی محصول PCR برای کنترل داخلی، ۱۵۰ جفت باز و محصول PCR هدف، ۱۰۰ جفت باز بود (۱۸). Hoorfar در سال ۲۰۰۴ مطالعه‌ای را در مورد نحوه‌ی ساخت کنترل داخلی انجام داد. وی، دو استراتژی را برای ساخت کنترل داخلی مطرح کرد (۱۹). Dreier در سال ۲۰۰۵ برای سیستم‌های Real time PCR اقدام به استفاده از نوعی کنترل داخلی نمود. وی از ژن Replicase باکتریوفاژ MS2 به عنوان یک کنترل داخلی استفاده کرد. در مطالعه‌ی Dreier بیان شد که کنترل‌های داخلی رقابتی می‌تواند کارایی و میزان تکثیر را کاهش دهد که دامنه‌ی تشخیص کمتری را ایجاد می‌کند. بنابراین در مطالعه‌ی مذکور، از الگوهای کنترل داخلی غیررقابتی که در آنها هدف و کنترل داخلی با set پرایمری متفاوت تکثیر می‌شوند، استفاده شده است. از مزیت های این روش آن است که تکثیر کنترل داخلی ممکن نیست تکثیر DNA هدف را تحت تأثیر قرار دهد. در مطالعه‌ی حاضر از نوع رقابتی کنترل داخلی استفاده گردید، زیرا در نوع غیر رقابتی لازم است برای هر تست، پرایمرهای ویژه برای کنترل داخلی طراحی شود که این امر در استفاده از کنترل داخلی رقابتی لازم نیست (۲۰).

علی‌رغم استفاده از جدیدترین و دقیق‌ترین پروتکل‌ها و یا مجهزترین دستگاه‌ها در تست تشخیصی PCR، تا زمانی که کنترل مثبت، کنترل منفی و کنترل داخلی در یک تست PCR وجود نداشته باشد، نمی‌توان از آن به عنوان یک روش تشخیصی مطمئن و استاندارد نام برد. بنابراین، در این مطالعه با طراحی و ساخت کنترل داخلی به روش رقابتی، سعی بر استانداردسازی روش PCR در تشخیص جنس مایکوپلاسما شده است.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مؤسسه دانش بنیان ایرانیان ژن فناور که امکانات لازم را جهت این تحقیق طی طرح پژوهشی فراهم نمودند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

REFERENCES

1. Gransden WR. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed (CD-ROM). J Clin Pathol 1999; 52: 237-8.

2. Clyde Jr WA. Clinical overview of typical *Mycoplasma pneumoniae* infections. Clin Infect Dis 1993; 17(Suppl. 1): S32-S36.

3. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology; 2007.

4. Balows A. Molecular medical microbiology. Diagnostic microbiology and infectious disease; 2002. p. 173-4.

5. Kurzai O, Kothe E. Medical microbiology. J Basic Microbiol 2010; 50.

6. Dorigo-Zetsma JW, Verkooyen RP, Van Helden HP, Van der Nat H, Van den Bosch JM. Molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* in adults with community acquired pneumonia requiring hospitalization. J Clin Microbiol 2001; 39: 1184-6 .

7. Shahhosseiny MH. Basic molecular diagnosis. Publisher: Islamic Azad University; 2005. p. 12-35.

8. Hoorfar J, Cook N. Critical aspects of standardization of PCR. Methods Mol Biol 2002; 216: 51-64.

9. Burkardt HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. Clin Chem Lab Med 2000; 38(2): 87-91.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-07-01]

10. Sachadyn P, Kur J. The construction and use of a PCR internal control. Mol Cell Probes 1998: 12(5): 259-62.

11. Abdulmawjood A, Roth S, Bulte 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: 335-9.

12. Brightwell G, Pearce M, Leslie D. Development of internal controls for PCR detection of *Bacillus anthracis*. Mol Cell Probes 1998; 12: 367-77.

13. Harasawa R, Mizusawa H, Nozawa K, Nakagawa T, Asada K, Kato I. Detection and tentative identification of dominant Mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. Res Microbiol 1993; 144: 489-93.

14. Razin S. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (mollicutes). Microbial Rev 1985; 49: 419-55.

15. Shaw RJ, Taylor GM. Polymerase chain reaction: Applications for diagnosis, drug sensitivity and strain identification of *M. tuberculosis* complex. In: Clinical Tuberculosis. London: Davies, Chapman and Hall; 1998. p. 47.

16. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. Genome Res 1996; 6(10): 995-1001.

17. 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: 1354-6.

18. Jones RN, Neale ML, Beattie B, Westmoreland D, Fox JD. Development and application of a PCR based method including an internal control for diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. J Clin Microbiol 2000; 38(1): 1-6.

19. Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fatch P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. J Clin Microbiol 2004; 42(5): 1863-8.

20. Dreier J, Störmer M, Kleesiek K. Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays. J Clin Microbiol 2005; 43(9) : 4551-7.

[Downloaded from pajoohande.sbmu.ac.ir on 2026-07-01]