

طراحی کنترل داخلی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز باکتری مایکوپلاسمما به روش

رقابتی

تمنا نفریه^۱، الهام مسلمی^۲، محمد رضا ذوالقدری^۱، محمدحسن شاه حسینی^{۲*}

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 شهرقدس، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مایکوپلاسمها مهمترین و جدی‌ترین آلوده‌کننده‌های فرآورده‌های بیولوژیک تولیدی در کشت‌های سلولی می‌باشد. تکنیک PCR جهت شناسایی سریع جنس مایکوپلاسمما، 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 مایکوپلاسمما از طریق ساخت کنترل داخلی به روش رقابتی است.

مواد و روش‌ها: با استفاده از پرایمرهای ویژه‌ی هدف rRNA 16S، تست PCR جهت تشخیص مولکولی جنس مایکوپلاسمما 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 R PTZ57 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 مایکوپلاسمما، 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 دقیقت بالای تکنیک PCR، نتایج منفی و مثبت کاذب که به دلیل وجود مهارکننده‌های واکنش رخ می‌دهند، می‌تواند کارایی این روش را کاهش دهد. استفاده از یک DNA دیگر به عنوان کنترل داخلی می‌تواند این خطاهای را شناسایی کند.

واژگان کلیدی: جنس مایکوپلاسمما، 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

آلودگی شوند. در واقع، مایکوپلاسمها 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 فوق العاده بالایی است (۱). روش‌های شناسایی مایکوپلاسمما شامل روش‌های بیوشیمیایی مانند آدنوزین فسفوریلаз که قادر ویژگی‌اند، روش‌های بر پایه‌ی

مایکوپلاسمها 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

*نویسنده مسؤول مکاتبات: محمدحسن شاه حسینی؛ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرقدس، گروه میکروبیولوژی؛ مؤسسه ایرانیان ژن فناور (IGF)، تهران، ایران؛ تلفن: ۰۹۱۲۳۰۴۰۶۹؛ پست الکترونیک: shahhosseiny@yahoo.com

یعنی عدم حضور توالی هدف، می‌تواند در عین حال به این معنا باشد که واکنش به دلایلی مانند اختلال در دستگاه PCR ترموسایکلر، مخلوط PCR نادرست، فعالیت آنزیم DNA پلیمراز، یا حداقل حضور مواد بازدارنده در ماتریکس نمونه، ممانعت شده باشد. بر عکس، در یک PCR با کنترل داخلی، یک سیگنال کنترل همیشه تولید می‌گردد که نشان‌دهندهٔ تکثیر کنترل داخلی می‌باشد. این کنترل داخلی حتی در عدم حضور توالی هدف مورد آزمایش، تکثیر می‌گردد و اگر تکثیر نشود به دلایل مختلف، اشکالی در پروسهٔ تکثیر وجود داشته است.^(۸)

دو استراتژی کلی شامل کنترل داخلی رقابتی و کنترل داخلی غیر رقابتی برای ساخت کنترل داخلی وجود دارد. با استفاده از تکنیک پرایمر مرکب، هدف و کنترل داخلی با یک جفت پرایمر، در همان شرایط (شرایط یکسان) و در همان 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)، یک نکتهٔ حساس و مهم می‌باشد. در استراتژی غیر رقابتی، پرایمرهای هدف و اینترنال کنترل متفاوتند. این استراتژی، مستلزم یک تست PCR با دو واکنش متفاوت است که به طور همزمان باشیست جلو روند. وقتی هدف و کنترل داخلی در این روش تکثیر شوند، نتایج معتبر است. از معایب روش تکثیر غیررقابتی، این است که این روش نوعاً به طور دقیق، تکثیر هدف اولیه ناشی از تفاوت در ترادف پرایمرها را منعکس نمی‌نماید. عیب دوم آن است که کاربرد کنترل داخلی در فرم غیر رقابتی نیازمند توسعهٔ دو PCR و بهینه کردن آنها در یک شرایط PCR است که می‌تواند باعث کاهش کار یک تکثیر و یا هر دو هدف و کنترل داخلی گردد.^(۹-۱۲)

هدف مطالعهٔ حاضر، طراحی و ساخت کنترل داخلی تکثیری تست PCR تشخیصی جنس مایکوپلاسمما به روش رقابتی و از طریق PCR-Cloning است.

مواد و روش‌ها

استخراج DNA از مایکوپلاسمما. تست PCR با استفاده از DNA استخراج شده از روش Boiling از گونه‌های مایکوپلاسمما پنومونیه، مایکوپلاسمما اورال و مایکوپلاسمما آرجنینی تهیه شده از مؤسسه رازی بهینه گردید. مراحل استخراج به این ترتیب بود: ۱) یک میلی‌لیتر از کشت مایکوپلاسمما به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. بعد از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه،

رنگ‌آمیزی و دو رگه‌سازی که دارای حساسیت کم و نوعاً ویژگی پایین هستند و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR می‌باشد^(۲). روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک مانند PCR، به دلیل داشتن حساسیت، ویژگی و دقت بیشتر، جزو روش‌هایی مناسب جهت تشخیص طیف وسیعی از عوامل آلوده‌کننده، خصوصاً مایکوپلاسمها هستند که در دهه‌ی اخیر توسعهٔ فراوانی یافته است^(۳-۵). با این حال، میزان حساسیت این تکنیک تا حد زیادی به: ۱) روش استخراج DNA، ۲) ژن هدف، ۳) پرایمرهای طراحی شده، ۴) روش شناسایی محصول، ۵) نوع نمونه و بسیاری فاکتورهای دیگر بستگی دارد. پرایمرهای طراحی شده عموماً جهت بخش‌های مشترک ژن 16S rRNA یا بخش‌های 16S-23S rRNA و یا rRNA هدف‌های دیگر طراحی شده است^(۶). توالی ژن‌های تعداد زیادی از گونه‌های مایکوپلاسمما، تعیین ترادف شده است. مطالعات فیلوزنیک و سیستماتیک این ارگانیسم‌ها و همین‌طور بررسی‌های کامبیوتربی مقایسه‌ای این ترادف‌های ریبوزومی، مؤید بخش‌هایی به شدت ثابت و مشترک در همهٔ انواع مایکوپلاسمایی است که جهت طراحی پرایمرهای PCR مناسب به کار می‌روند. تکنیک تشخیصی مولکولی PCR، نه تنها سریع و با قابلیت تکرار بالا، بلکه تکنیکی با حساسیت و پیچگی زیاد جهت شناسایی مایکوپلاسمها می‌باشد^(۱). علاوه بر تمام مزیت‌هایش، دارای مشکلاتی نیز می‌باشد. یکی از این مشکلات، مسئلهٔ آلودگی است. به دلیل حساسیت فوق العاده و قدرت تکثیر زیاد PCR، هر قطعهٔ DNA خارجی که وارد محیط PCR می‌شود، مورد تکثیر قرار گرفته و ممکن است نتایج غیر واقعی به وجود آورد. حساسیت این روش ایجاد می‌کند که ملاحظات شدیدی اعمال گردد تا به این وسیله از تکثیر آلوده‌کننده‌هایی مانند DNA از آزمایش‌های قبلی جلوگیری به عمل آید. گاهی نیز باقی‌مانده‌ی قطعات DNA حاصل از تکثیر های قبلی باعث آلودگی PCR می‌شود که در این مورد شستشوی زیاد و دقیق، مشکل گشا است. ولی با تمام نکات گفته شده فوق برای جلوگیری از اشتباهات احتمالی در PCR، همواره باید کنترل‌های مثبت و منفی در هر سری از آزمایش‌ها وجود داشته باشند^(۷). یکی از مهمترین مسائل در مطالعات چاپ شده در زمینهٔ تشخیص PCR جنس مایکوپلاسمما، نداشتن کنترل داخلی در بیشتر این مقالات است. بر خلاف کنترل مثبت، کنترل داخلی عموماً یک توالی DNA غیر هدف حاضر در نمونه است که به طور همزمان با توالی هدف تکثیر می‌گردد. در یک PCR بدون کنترل داخلی، یک پاسخ منفی

طراحی کنترل داخلی PCR مایکوپلاسما به روش رقابتی

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

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 ۱۲۰۰۰ 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.

جدول ۱. توالی پرایمروها 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'

بود.

ساخت کنترل داخلی. جهت ساخت کنترل داخلی رقابتی به روش PCR-Cloning، پرایمروها جلویی و عقبی PCR جنس مایکوپلاسما در بخش ۵' پرایمروهای ژن کینتوپلاست لیشمانیا با اندازه‌ی محصول ۶۲۰ جفت باز، به صورت دم (Tail) طراحی و سنتز شد (جدول ۱). برای انجام واکنش DNA PCR جهت تکثیر قطعه‌ی کنترل داخلی، ۲ نانوگرم استخراج شده‌ی لیشمانیا با استفاده از پرایمروها جلویی و عقبی کنترل داخلی با غلظت نهایی ۰/۰۰ میکرومول، ۰/۰۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X)، ۰/۰۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (MgCl₂) از غلظت ۰/۰۰۰ میکرولیتر کلرید منیزیم (MgCl₂) از غلظت ۰/۰۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۰/۰۱ میلی‌مولار) و ۰/۰۰۰ میکرولیتر مخلوط Taq DNA Polymerase (بیوفلوکس)، در حجم نهایی ۰/۰۰۵ 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 مشاهده 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 داکومتیشن، بررسی گردید.

کلونینگ محصول PCR و کنترل داخلی. قطعات حاصل (محصول PCR و کنترل داخلی) بعد از خالص سازی با پلasmid pTZ57R کمپانی فرمانتاس به مدت یک ساعت در ۲۲ درجه سانتی‌گراد اتصال و سپس در باکتری اشريشیا کلی JM107 ترانس‌فورم و کانسٹراکت حاصل از طریق Blue/White Screening T/A و IPTG انتخاب گردید. با استفاده از کیت GAL cloning کمپانی Thermo Scientific در

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 پرایمروها جلویی و عقبی مخصوص جنس مایکوپلاسما با غلظت نهایی ۰/۰۰۰ میکرومولار، ۰/۰۵ میکرولیتر از بافر (۱۰X)، ۰/۰۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (MgCl₂) از غلظت ۰/۰۰۰ میلی‌مولار، ۰/۰۰۰ میکرولیتر مخلوط dNTP (۰/۰۱ میلی‌مولار) و ۰/۰۰۰ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (بیوفلوکس)، در حجم نهایی ۰/۰۰۵ 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 مشاهده 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 داکومتیشن، 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 ۲۶۰ nm تعیین شده بود، تعداد کپی DNA مایکوپلاسما در آن مشخص شده بود، آمده گردید و سپس به صورت سریال، رقیق شد. تعیین حساسیت تست PCR بهینه شده با استفاده از تهیه رقت‌های مختلف از Mycoplasma spp صورت گرفت که از یک تا یک میلیون DNA مایکوپلاسما به ازای هر واکنش

DNA 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)، *Staphylococcus aureus*، استافیلوکوکوس اورئوس (*H. influenza*), مایکوباتکریوم (*Mycobacterium tuberculosis*)، توبرکلوزیس (*Saccharomyces cerevisiae*) و ساکارومیسیس سرویزیه (*Escherichia coli*) مشاهده نشد. از طریق تهیه‌ی رقت‌های سری از DNA استخراج شده باکتری و انجام تست PCR، حد تشخیص (حساسیت) در حد ۱۰ کپی (۱۰ باکتری) در نمونه‌ی مورد آزمایش به دست آمد (شکل ۱).

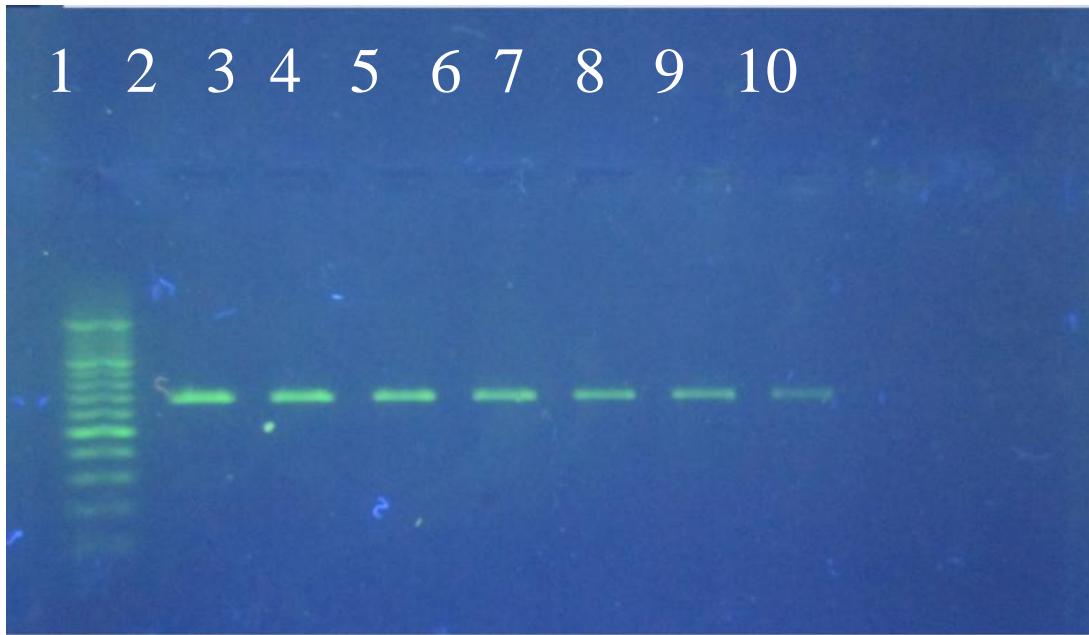
وکتور pTZ57/R کلون گردید. پلاسمیدهای حاوی آمپلیکون GeneJET Plasmid Miniprep Kit (K0502) کمپانی Thermo Scentific استخراج گردید. سپس با روش PCR، پلاسمیدهای حاوی محصول PCR و کنترل داخلی با استفاده از پرایمرهای تشخیصی، تأیید گردید. تعیین غلظت ایده‌آل کنترل داخلی. هدف از تعریف غلظت DNA ایده‌آل کنترل داخلی برای PCR، تأیید غلظت مناسب کنترل داخلی است که با هدف، کمترین رقبابت در تکثیر را انجام دهد. جهت به دست آوردن غلظت بهینه، غلظت‌های متفاوت پلاسمید حاوی کنترل داخلی و DNA جنس مایکوپلاسمای استاندارد، مورد آزمایش قرار گرفت. غلظت DNA جنس مایکوپلاسمای مورد استفاده در تست و همچنین کنترل داخلی، به وسیله‌ی اسپکتروفوتومتر در A260 تعیین شد. رقت‌های حاوی مقادیر متفاوت عامل که از طریق serial dilution تهیه شده بود، با مقادیر ثابت کنترل داخلی، تست گردید. برای PCR، ۲ نانوگرم از



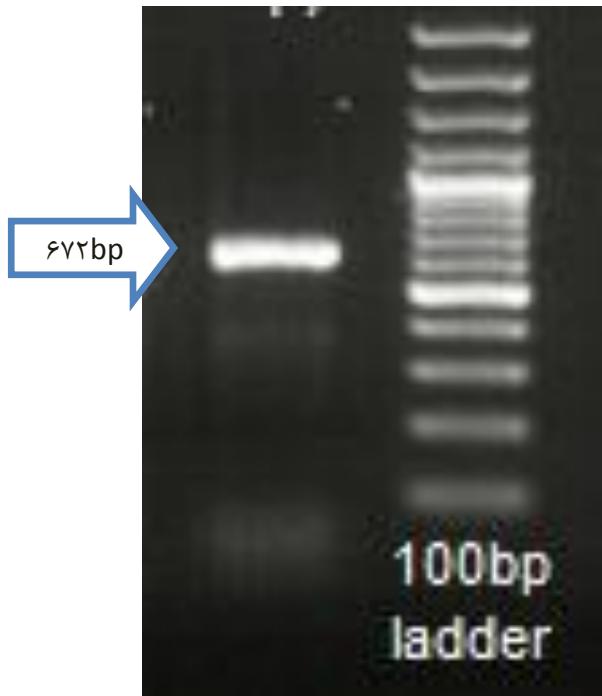
شکل ۱. حساسیت تست تشخیص PCR جنس مایکوپلاسمای لاین ۱: سایز مارکر 100 bp DNA Ladder plus. لاین ۲: کنترل مثبت، لاین ۳ الی ۹: به ترتیب یک میلیون، صد هزار، ده هزار، هزار، صد، ده و یک مایکوپلاسمای ازای هرو واکنش، لاین ۱۰: کنترل منفی.

کردن کنترل داخلی، غلظت به کار رفته‌ی آن (تعداد) اهمیت فوق العاده بالایی دارد، چرا که حضور مقادیر بالای کنترل داخلی، موجب رقبابت با الگوی DNA ژنومیک شده و بنا بر این نتیجه‌ی منفی کاذب ایجاد می‌شود. لذا کاربست تعداد معادل ۱۰۰۰ پلاسمید حاوی کنترل داخلی با ۲ نانوگرم از DNA نمونه‌ی استخراج شده، موجب کمترین اثرات رقبابتی گردید.

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



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 ۱ پلاسمید، لاین ۸: PCR با الگوی یک پلاسمید، لاین ۹: کنترل منفی.



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

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

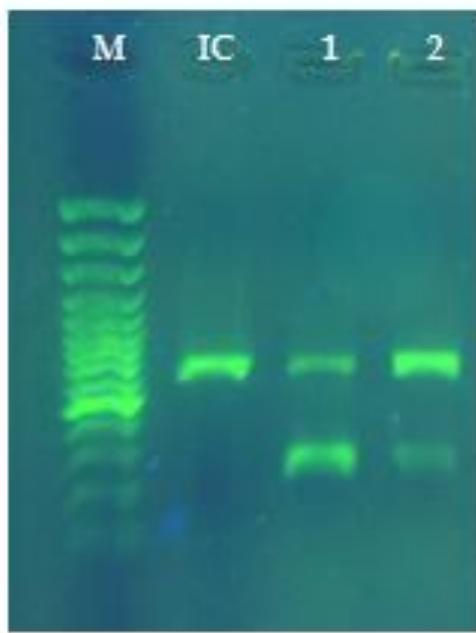
بحث

مایکوپلاسماها ارگانیسم‌های غیر قابل رویت با میکروسکوپ‌های نوری و مهمترین عوامل آلوده‌کننده‌ی کشت‌های سلولی هستند. این عوامل آلوده‌کننده‌ی پنهان، به طرق مختلفی همچون شناسایی تغییر رنگ محیط‌های کشت، شناسایی آنتی‌زنگ‌های 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 به طور دوره‌ای در آزمایشگاه‌هایی که با کشت سلول سروکار دارند، بایستی انجام شود (۱۳، ۱۴).

به کمک تکنیک PCR می‌توان فقط تعداد محدودی از کپی‌های ژنوم

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. بر عکس، 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 به کارگیری 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 پرایمیر 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 DNA 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 ۵۰۰ bp، 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).



شکل ۴. نتایج PCR با تعداد مشخص DNA مایکوپلاسما پنومونیه. لاین سایز مارکر 100 bp DNA ladder plus فرمتساس، لاین کنترل داخلی (IC): تکثیر کنترل داخلی به تنها یی، 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 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 به وجود 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

طراحی کنترل داخلی PCR مایکوپلاسما به روش رقابتی

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 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 مزیت‌های 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.

در سال ۱۹۹۶ Gibson و همکارانش، یک الگوی کنترل داخلی حاوی سکانس‌های پرایمر یکسان با آمپیلیکون cystic fibrosis transmembrane mRNA برای transductance regulator تمایز، یک تفاوت در سکانس کنترل داخلی به وجود آوردند. یک پروب کنترل داخلی با رنگ گزارشگر فلورسنت در جهت هیبرید شدن با آمپیلیکون کنترل داخلی طراحی شد. کنترل داخلی در هر لوله واکنش، برای آنالیزهای CFTR mRNA استفاده شد. این روش، سهولت و حداقل کارآمدی را برای Reverse Transcriptase PCR 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، Kolk دانشمندی به نام Mycobacterium tuberculosis و ساخت IC رقابتی، از قطعه‌ی ۶۱۰ IS موجود در M. tuberculosis استفاده نمود. محصول IC تست این مطالعه ۳۰۱ bp و اندازه‌ی محصول هدف ۲۴۵ bp 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). در سال Dreier

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.

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. Hoofar 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.