تأثیر کاهش حجم مخلوط واکنشی و افزایش سرعت آمپلیفیکاسیون DNA بر روی حساسیت تکنیک واکنش زنجیرهٔ پلیمراز

دکتر مسعود حاجیا*

* استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان

چکیده

در سالهای اخیر با وجود آنکه گزارش‌های رضایتبخش در بکارگیری PCR جهت تشخیص عفونتهای کلینیکی ارائه گردیده، معهذا این تکنیک هنوز نتوانسته بواسطه مشکلاتی نظیر هزینه بالا به آزمایشگاه تشخیصی راه پیدا نماید. معرفی PCR سریع در حجم اندک و با استفاده از ترموسیکلرهای مخصوص، سبب افزایش سرعت وکاهش میزان مواد مصرفی گردیده است. اما بکارگیری آن مستلزم برخورداری از دستگاهها و امکانات بخصوص بوده و در نتیجه نیازمند یک سرمایه‌گذاری اضافی برای آزمایشگاهها میباشد. در این مطالعه کاهش حجم مخلوط واکنشی با هدف افزایش سرعت و تقلیل هزینه مواد مصرفی با استفاده از ترموسیکلرهای معمولی و وسایل روتین آزمایشگاه مورد مطالعه قرار گرفت.

در این بررسی DNA مایکوپلاسما پنومونیه پس از تحت تأثیر قرار گرفتن با پروتئیناز K، با روش فنل کلروفرم خالص گردید. آزمایش PCR در حجم‌های متفاوت و برنامه‌های گوناگون انجام پذیرفت و محصول بدست آمده با ژل آگارز الکتروفرز آنالیز گردید.

نتایج حاصله در طی آزمایشات متعدد با حجم‌های متفاوت و برنامه‌های گوناگون لازم برای یک سیکل تکثیر تأیید نمود که حجم مخلوط واکنشی در لوله‌های معمولی آزمایش (ependorff) از ۱۰۰ ul به ۱۰ ul و همچنین زمان مورد نیاز از ۶/۵ دقیقه به ۳/۵ دقیقه برای هر سیکل تکثیر قابل کاهش بوده، بدون آنکه حساسیت تست کاسته گردد. در مرحله بعدی به منظور اطمینان از حساسیت شرایط جدید تست، روش مذکور با نمونه‌های کلینیکی که در حالت اصلی دارای نتیجه مثبت بودند مورد آزمایش قرار گرفت. کلیه نتایج حاصله نشان داد که تمامی نمونه‌های مثبت در حالت اصلی در حالت جدید نیز دارای نتایج مثبت بودند.

انجام PCR در حجم‌های اندک، نه تنها سبب تقلیل هزینهٔ انجام تست به میزان قابل توجهی میگردد بلکه میتواند سرعت انجام آمپلیفیکاسیون را به دو برابر افزایش دهد.

کلید واژه‌ها: تشخیص / مایکوپلاسماپنومونیه / واکنش زنجیره پلیمرها

مقدمه

بی‌شک در دههٔ بعد، استفاده از تکنیکهای تشخیصی مبتنی بر تعیین DNA اختصاصی میکروارگانیسمها، دارای نقش ویژه‌ای در آزمایشگاه میکروبیولوژی تشخیصی خواهند بود. در میان این روشها، تکنیک PCR بواسطهٔ سرعت، حساسیت، و ویژگی مطلوب آن دارای گسترش سریعی میباشد(۱،۲،۳). البته علاوه بر مزیت‌های فوق، نکتهٔ مهمی که در کاربرد هر شیوه در آزمایشگاههای تشخیصی مورد توجه قرار میگیرد هزینهٔ انجام آزمایش میباشد (۴،۵). همچنین عامل دیگری که می‌تواند مورد اشاره قرار گیرد سرعت آزمایش و آماده شدن جواب آن

می‌باشد. در صورتی این روش می‌تواند در آزمایشگاه‌های تشخیصی بعنوان یک روش قابل اعتماد مطرح شود که علاوه بر نکات ذکر شده از نظر سرعت با روش‌های معمول نیز قدرت رقابت داشته‌باشد. فاکتورهای متعددی میتوانند سبب افزایش سرعت گردند، ارائه روشهای متفاوت تخلیص با هدف کوتاه نمودن مراحل آن (۶) دارای تأثیر مثبتی در این ارتباط بوده است. عامل مؤثر دیگر کوتاه نمودن زمان لازم برای آمپلیفیکاسیون DNA مورد نظر میباشد. بدیهی است هرگونه کاهشی در تعداد چرخه‌های تکثیر منجر به کاهش حساسیت آزمایش خواهد گردید. بر این اساس دستورالعمل انجام PCR در حجم‌های اندک با استفاده از لوله‌های موئین و ترموسیکلر خاص به منظور کاستن زمان مورد نیاز برای انجام یک چرخه و در نهایت افزایش قابل ملاحظه سرعت تست ارائه گردیده است(۷). ترموسیکلرهای مورد استفاده در PCR قادر به تنظیم اتوماتیک درجه حرارت‌های متفاوت به منظور تکثیر قطعه DNA مورد هدف میباشد. در شیوهٔ PCR سریع دستگاه مزبور میتواند تغییرات مورد نظر را با سرعت بسیار بالا اعمال نموده و لوله‌های موئین بکار گرفته شده میتوانند حرارت ایجاده شده را به تمامی نقاط مخلوط واکنشی یکسال انتقال دهند.

با توجه به آنکه تشخیص مایکوپلاسما پنومونیه در گرفتاری‌های قلبی و مغزی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بدوه و روش‌های رایج دارای حساسیت کافی نمی‌باشند و با در نظر گرفتن آنکه بکارگیری تکنیک PCR سریع در ارتباط با پروتکل ارائه شده مستلزم وجود ترموسیکلر خاص و لوازم مخصوصی بوده،دراین‌بررسی‌برآن شدیم‌امکان کاهش حجم مخلوط واکنشی‌وافزایش سرعت‌تکثیردر هر سیکل PCR را بااستفاده‌ازترموسیکلرها و وسایل معمولی در شرایط روتین و با امکانات متداول آزمایشگاه مورد مطالعه قرار دهیم.

مواد و روشها

ارگانیسم، محیط کشت، و روش خالص سازی DNA: ارگانیسمی که در این بررسی مورد استفاده قرار گرفت، M. pneumonia سویهٔ ۱۰۱۱۹ بود. برای کشت مایکوپلاسما از محیط انتخابی مایکوپلاسما به همراه مکمل P- استفاده بعمل آمد.

برای خالص سازی DNA، ابتدا ارگانیسم در ۱۴۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریوفوژ شد و ته نشین آن در ۵۰۰ul بافر TE[۳] که واجد ۲۵۰ug/ml پروتئیناز K بود شناور گردید، سپس به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت ۵۶®C قرار داده شد. در ادامه DNA توسط فنل- کلروفرم خالص شده وبا اتانول رسوب داده شد(۸).

PCR amplification و الکتروفورز: به منظور انتخاب پرایمر با توجه به ارزیابی گزارش شده بر روی انواع جفت پرایمرهای بکار گرفته شده در تست‌های متفاوت PCR مایکوپلاسما(۹) جفت پرایمر گزارش شده توسط Luneberge و همکاران (۱۰) جهت آزمایش انتخاب گردید. جفت پرایمر مذکور بطور اختصاصی قادر میباشد ژن tuf از M.pneumoniae را تعیین نماید(۱۳).

مخلوط واکنشی در حجم‌های متفاوتی (۱۰۰μl، ۵۰، ۴۰، ۳۰، ۲۰، ۱۰) تهیه گردید، که شامل ۰/۳M از هریک از پرایمرها، ۰/۲M از هر dNTP، ۲/۵mM $MgCl_2$ و ul ۱U/۱۰۰ آنزیم taq پلیمراز بود. برای انجام PCR از ترموسیکلر (PHC1 techne) استفاده بعمل آمد. ده ماکرولیتر از محصول PCR توسط آگارز ژل الکتروفورز ژل الکتروفورزیس در TBE بافر (۱۰ mM tris/HC1 pH 8.0 و 1 mM EDTA) آنالیز شده و محصول حاصل از آمپیفیکاسیون DNA توسط اتیدیوم برماید در ترانس ایلومیناتور مورد مشاهده قرار گرفت.

روش تعیین کمیت: تعیین کمیت مقدار DNA کروموزومی توسط اسپکتروفوتومتری و در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر محاسبه گردید.

نتایج

در دستورالعمل انجام PCR در حجم‌های اندک با استفاده از ترموسیکلر خاص به منظور تأمین سریع حرارت لازم برای تمامی نقاط مخلوط واکنشی در مراحل سه گانه یک چرخهٔ تکثیر، از لوله‌های موئین استفاده بعمل می‌آید. با توجه به آنکه ترموسیکلرهای معمولی که در حال حاضر در بخش‌های میکروبیولوژی مولکولی استفاده میگردند برای لوله‌های آزمایش معمولی در حجم‌های متفاوت طرح ریزی گردیده است، لذاکاستن زمان لازم در هر سیکل PCR منوط به اطمینان یافتن از تامین دمای لازم برای تمامی نقاط مخلوط آزمایشی موجود در لوله آزمایشی میباشد تا تغییرات سریع درجه حرارت خللی در تکثیر محصول واکنش ایجاد ننماید. از آنجا که لوله‌های پلاستیکی مذکور در قسمت انتهایی دارای قطر کمتری میباشند، حجم مخلوط واکنشی نیز کاسته گردید. لذا ابتدا حساسیت تست در

حجم‌های متفاوت بررسی شده و با حجم اصلی که سایر شرایط لازم برای تعیین حساسیت تست با آن تعیین شده یعنی حجم ۱۰ul مورد مقایسه قرار گرفت تا حداقل حجمی که حساسیتی مشابه با آن را دارا باشد، انتخاب گردد.

مقایسه حساسیت تست در حجم‌های متفاوت: به منظور یافتن حداقل حجم مناسب، آزمایش تعیین حساسیت تست در حجمهای متفاوت صورت گرفت. حساسیت تست با حجم ۱۰۰ ul برای M. pneumoniae برابر با ۱۰fg بود که تقریباً برابر با ۱۳-۱۲ کپی کروموزوم میباشد. مشاهده گردید که همانگونه که حجم مخلوط واکنشی کاسته میگردد حساسیت تست نه تنها تغییر ننموده بلکه بندهای ایجاد شده در آگارز ژل الکتروفورز از ضخامت بیشتری برخوردار بوده و حتی بند حاصل از محصول amplification که نشان دهندهٔ وجود محصول است دیده می‌شود.

تأثیر کاهش زمان مراحل سه گانه سیکل تکثیر در حساسیت تست: در آزمایشی امکان کوتاه نمودن زمان لازم برای یک چرخهٔ تکثیر در حجم جدید مخلوط آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این آزمایش یافتن کوتاه‌ترین زمان ممکن برای یک چرخه تکثیر بود که دارای حساسیتی مشابه با حساسیت تست در برنامه اصلی باشد. برنامه‌های متفاوت مورد آزمایش در جدول شمارهٔ ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصله با DNA خالص شده روشن نمود برنامه شماره ۴ دارای نتایج قابل مقایسه‌ای با برنامه اصلی بوده و زمان لازم برای یک چرخهٔ تکثیر را از ۶/۵ دقیقه به ۳/۵ دقیقه کوتاه نموده بدون آنکه در حساسیت تست کاهشی رخ دهد. این کاهش در هر چرخه سبب گردیده که زمان لازم برای انجام کل تست از ۴/۵ ساعت به ۲/۵ ساعت تقلیل یابد.

کاستن بیش از این در زمان لازم برای هر مرحله از چرخهٔ تکثیر سبب کاهش حساسیت تست گردید. جهت بررسی حساسیت دستگاه تغییرات درجه حرارت هر ده ثانیه ثبت و منحنی مربوطه رسم گردید. مشاهدهٔ منحنی مذکور این نکته رانشان دادکه زمان واقعی درهرمرحله کمترازآن چیزی میباشد که در دستگاه ترموسیکلر ثبت گردیده‌است(تصویرشماره۱).

ارزیابی تست با نمونه‌های کلینیکی: بعد از مشخص شدن حداقل حجم مخلوط واکنشی و کوتاه‌ترین زمان لازم برای هر چرخهٔ تکثیر که تست دارای حداکثر حساسیت باشد، ضروری بود که شرایط جدید اجرای تست با نمونه‌های کلینیکی مورد ارزیابی قرارگیرد. برای این منظور ۳۴ سواب تنفسی انتخاب گردید و حساسیت تست در دو شرایط اصلی و شرایط جدید تکثیر محصول PCR مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصله موید آن بود که این تعداد ۹ نمونه که در شرایط اصلی تست مثبت بودند، در شرایط جدید (کاهض حجم و افزایش سرعت) نیز مثبت بودندکه به معنی حساسیت مشابه برای تست در هر دو وضعیت میباشد. همچنین همانگونه که انتظار میرفت بندهای حاصل از محصول PCR با شرایط جدید در آزمایش آگارز ژل الکتروفورز از وضوح و ضخامت بهتری برخوردار بودند (تصویر شماره ۲).

بحث

انجام PCR در حجمهای کوچک نه تنها بواسطه کاهش مواد و آنزیم‌های لازم تا یک دهم از نظر اقتصادی به صرفه‌تر میباشد بلکه‌منجربه افزایش سرعت نمونه شده که نهایتاً در راه یافتن آن به آزمایشگاه بعنوان یک آزمایش معمول کمک شایانی مینماید.

مشکلی که در انجام این آزمایش مهم جلوه مینماید کار با حجم اندک نمونه میباشد (۱۱) دو مشکل بالقوه مطرح است که یکی تبخیر در طی تکثیر محصول بوده و دیگری خطای پیپت برای این حجم اندک میباشد. به منظور

جدول شماره ۱: برنامه‌های متفاوت استفاده شده در آزمایش (اعداد برحسب ثانیه می‌باشد)

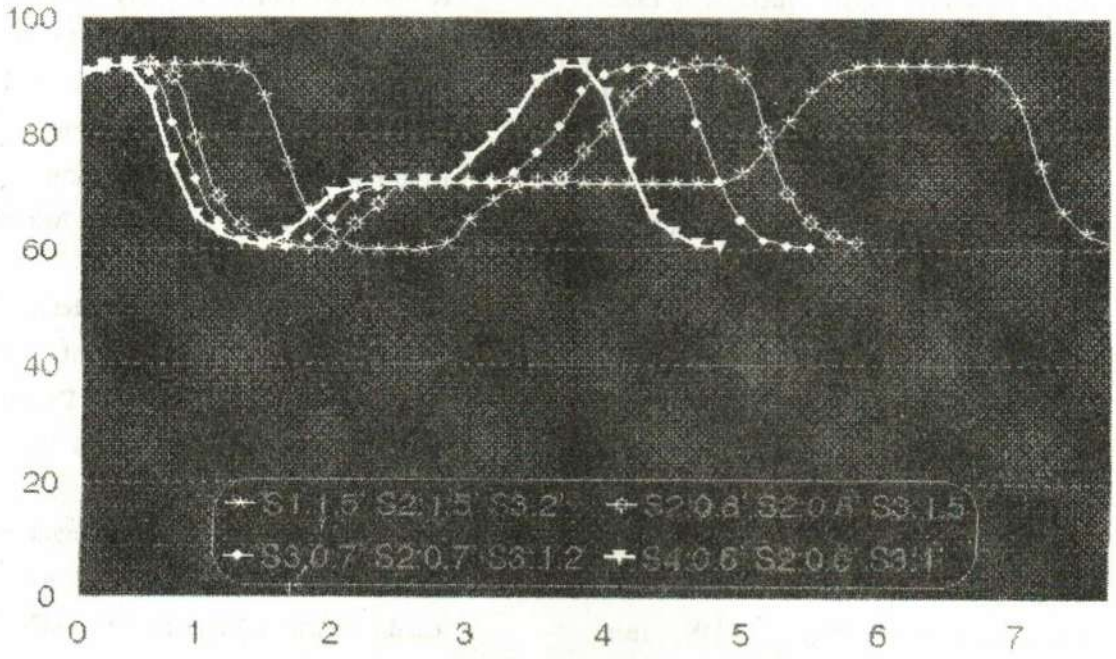
	Denaturation time / 92° C	Annealing time/ 60° C	Extension time/ 72° XC
برنامه۱	۹۰	۹۰	۱۲۰
برنامه۲	۴۸	۴۸	۹۰
برنامه۳	۴۲	۴۲	۷۲
برنامه۴	۳۶	۳۶	۶۰
برنامه۵	۳۲	۳۲	۶۴

جلوگیری از تأثیر تبخیر مخلوط واکنشی در حجم اندک که میتواند سبب تغییر غلظت مواد موجود در آن شوند، مخلوط واکنشی پس از افزودن DNA مورد آزمایش با روغن معدنی پوشانده شد. جهت جلوگیری از تأثیر خطای پیپت در حجم‌های اندک بر حساسیت تست، مخلوط آزمایشی در حجم بزرگتر تهیه شده و سپس به حجم‌های کوچکتر مناسب برای آزمایش تقسیم گردید.

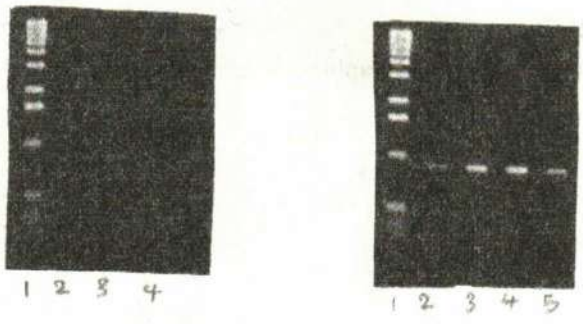
DNA نمونه‌های بالینی معمولاً در ۰/۵ml یافر برای آزمایش‌های معمول PCR شناور میگردد و ۱۰ الی ۲۰ ماکرولیتر برای آزمایش مورد استفاده قرار میگیرد. بهنگام

کاهش حجم مخلوط واکنشی به منظور جلوگیری از نتایج منفی کاذب، به نظر میرسد کار با حجم کوچک DNA اهمیت بیشتری داشته باشد. تحت این شرایط میتوان نمونهٔ DNA رادر ۱۰ ماکرولیتر شناور نموده و یک ماکرولیتر از آن

را برای تست استفاده نمود. زمانی که نمونه‌هایی نظیر CSF مورد آزمایش قرار میگیرند این نکته ازاهمیت ویژه‌ای برخوردار خواهند بود(۱۲)، چرا که تعداد ارگانیسم‌ها در این چنین نمونه‌هایی بسیار اندک بوده و تمامی DNA موجود در نمونه ضروری است که مورد استفاده قرارگیرد. دراین حالت برای انجام آزمایش DNA میتواند در مخلوط واکنشی PCR شناور گردد.



تصویر شماره۱: تغییرات درجه حرارت در طول یک سیکل تکثیر در برنامه‌های استفاده شده در آزمایشات انجام یافته



تصویر شماره۲: مقایسه وضوح بندهای محصول واکنش حاصل از تیترهای متفاوت DNA مایکوپلاسما پنومونیه در شرایط اصلی و جدید با حجم ۱۰μl

ردیف ۱ شامل مارکر DNA و ردیف ۲ الی ۵ شامل مقادیر متفاوتی از محصول PCR میباشد تصویر سمت چپ متعلق به الکتروفورز محصول PCR با حجم ۱۰μl بوده و تصویر سمت راست الکتروفورز محصول PCR راکه در شرایط اصلی تکثیر یافته نشان می‌دهد.

منابع

1. Vekris A, et al. Improved Microplatemimunoenzymatic Assay of PCR products for Rapid Detection of Mycoplasma pneumoniae. Mol Cell Probes 1995: 9: 25-31.
2. Buck GE, O'hara L, Summersgill JT. Rapid, Sensetive Detection of Mycoplasma pneumoniae in Simulated Clinical Specimens by DNA Amplification. J Clin Microbiol 1992: 3280- 3283.
3. Razin S. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. Mol Cell Probes 1994: 8: 497- 511.
4. Hillyard DR. The molecular approach to microbial diagnosis. Am J Clin Microbiol 1994: 101(Suppl): S18- S21.
5. Schluger NW, Rom WN. The polymerase chain reaction in the diagnosis and evaluation of pulmonary infections. Am J Respir Crit Care Med 1995: 152(1): 11-16.
6. Casas I, et al. New method for the extraction of viral- RNA and DNA from Cerebrospinal Fluid for Use in the polymerase Chain Reaction Assay. J Virol Methods 1995: 53: 25-36.
7. Wittwer CT, Reed GB, Ririe KM. Rapid Cycle DNA Amplification. In: Mullis KB, Ferr F, Gibbs RA. Polymerase Chain Reaction. Boston: Brikhauser, 1994.
8. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
9. Hajia M, Storey CC. Comparison of four PCR Tests for the Detection Mycoplasma pneumonia. Med J of the Islamic Republic of Iran 1999: 13(1): 75-59.
10. Lunerberg E, Jensen JS, Frosch M. Detection of Mycoplasma pneumonia by polymrrase chain Reaction and Nonradioactive Hybridization in Mictrotiter Plates. J Of Clin Microbiol 1993: 31(5): 1088- 1094.
11. Vaneechoutte M, Van Eldere. The Posibilities and Limitations of Nucleic Amplification Technology in Diagnostic Microbiology. J Med Microbiol 1997: 46: 188-194.
12. Shankar P, et al. Rapid Diagnosis of Tuberculous Meningitis by Polymerase Chain Reaction. Lancent 1991: 337: 5-7.

۱۳. حاجیا، مسعود؛ السنوری، کریستوفر: کاربرد PCR-hybridization در تشخیص عفونتهای ناشی Mycoplasma pneumoniae. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی همدان، ۱۳۷۸، شمارهٔ ۱۲، صص: ۱۰-۵.

Effect of Lowering PCR Reaction Volumes and Increasing the Speed of DNA Amplification on the Sensitivity of PCR

M. Hajia, Ph. D

ABSTRACT

Recently, PCR is being reported more frequently with satisfactory results on the diagnosis of clinical infections. Widespread availability of PCR promises a sensitive and specific alternative, to traditional methods, but these benefits must be balanced against cost. Protocols using small volumes have described where the reaction taken place in capillary tubes, and small volumes work when specialized thermocycler used. Despite its benefits on increasing the speed and decreasing the cost, this technique needs special equipment and thermocycler to perform which may not be possible for most molecular diagnostic laboratories. In this study, we wanted to evaluate effects of reducing time and volumes of reagents and therefore increasing speed and lowering reagent costs by routine equipment and ordinary thermocycler.

In this study, M. pneumoniae DNA was extracted by phenol Chloroform method after treating with proteinase K. PCR was performed in different volumes and various amplification, and PCR products were analyzed by gel agarose electrophoresis.

Experiments performed with extracted M. pneumoniae DNA confirmed that volume of reaction mixture can be decreased from 100 to 10 ul. Obtained results also proved amplification time can be decreased from 6.5 to 3.5 minute for each cycle without losing of the sensitivity. These finding indicate dropping of the cost up to one tenth and necessary amplification time to the half in comparison with conditions. In the next step 34 throat swabs were tested with both conditions. All specimens had same sensitivity for optimized and main conditions.

Performing PCR in small volumes not only reduce the cost of the test, but also can remarkably increase speed of the DNA amplification.

Keywords: Diagnosis/ Mycoplasma Pneumoiae/ Polymerase Chain Reaction