فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۵۵- ۶۸
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۸/۰۷

استاندارد کردن PCR تشخیصی به وسیله اینترنال کنترل تکثیری

محمدحسن شاه حسینی *: دانشیار بیوتکنولوژیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، تهران، ایران، shahhosseiny@yahoo.com
مریم قهری: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، موسسه ایرانیان ژن فناور (IGF)، تهران، ایران، mghahri@rocketmal.com
محمد امین محمودی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، موسسه ایرانیان ژن فناور (IGF)، تهران، ایران، apius_mj@yahoo.com
الهام مسلمی: استادیار سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، تهران، ایران، moslemi60@yahoo.com

چکیده

مقدمه: بروز نتایج متفاوت در آزمایشگاه‌ها به علت استاندارد نبودن، از معایب روش‌های تکثیر مولکولی است. در بیشتر مقالات چاپ شده در زمینه تشخیص PCR عوامل عفونی، اینترنال کنترل تکثیری (IC) وجود ندارد. هدف از پژوهش حاضر، طراحی و توسعه یک روش ساده و سریع، برای ساخت اینترنال کنترل آزمون PCR در آزمایشگاه‌های تشخیصی است.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، برای ساخت اینترنال کنترل رقابتی، از پرایمرهای مرکب و روش PCR-Cloning استفاده شد. بدین ترتیب که پرایمرهای جلویی و عقبی تشخیص PCR *ویروس هپاتیت (HBV)*، *ویروس هرپس سیمپلکس (HSV)*، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB)*، *مایکوپلاسما پنومونیه (Mpn)*، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس (Cne)*، *جنس سالمونلا (Sal. sp)* و جنس مایکوپلاسما (M. sp) را در بخش '۵ پرایمرهای ژن کینتوپلاست لیشمانیا، به شکل دم طراحی و سنتز شد. اینترنال کنترل‌های تکثیری با پلاسمید pTZ57R الحاق و در باکتری *اشریشیاکلی* JM107 ترانسفورم شد. تعداد حداقل IC در هر واکنش PCR از طریق رقیق‌سازی و همین‌طور طیف پاسخ PCR همراه با IC بررسی شد.

نتایج: *HBV–HSV–MTB–MPN–Cne–Sal. sp–* و *M. sp* با پرایمرهای اختصاصی به ترتیب برابر با 272bp-284bp-415bp-345bp-245bp-454bp-262bp و محصول اینترنال کنترل هم به ترتیب 660bp-662bp-660bp-669bp-661bp-668bp-672bp جفت باز بود، که از نظر اندازه، اختلاف مطلوبی بین محصول PCR و IC وجود دارد و به آسانی در ژل قابل تفکیک است. تعداد حداقل IC در هر واکنش، ۱۰۰۰ عدد تعیین شد. حداقل و حداکثر حساسیت آزمون PCR همراه با IC برای همه عوامل در حد مطلوبی به دست آمد. در آزمون ویژگی با عوامل مختلف هم، هیچ محصول ناخواسته‌ای مشاهده نشد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج منفی و مثبت کاذب که به علت‌های مختلف در روش PCR رخ می‌دهد از مشکلات مهم این روش جذاب است. استفاده از یک اینترنال کنترل در تشخیص مولکولی به عنوان کنترل داخلی، می‌تواند این خطاها را شناسایی کند.

واژه‌های کلیدی: PCR، اینترنال کنترل، PCR-Cloning

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

پیشرفت‌های شگرف بیوتکنولوژی و زیست‌شناسی مولکولی در سال‌های گذشته موجب تغییر روش‌های تشخیصی عوامل میکروبی، از روش‌های بر پایه کشت به روش‌های مولکولی و بیشتر بر اساس تکثیر اسیدهای نوکلئیک شده است (۱). کاربرد روش‌های مولکولی بر پایه PCR برای شناسایی و تعیین مقدار اسیدهای نوکلئیک در پژوهش و درمان، روز به روز گسترده‌تر می‌شود. از دهه ۹۰ یک افزایش انفجاری در تعداد مقالات چاپ شده در زمینه روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک به ویژه روش PCR در شناسایی عوامل بیماری‌زا اتفاق افتاده است. شایان ذکر است، متغیرهایی مانند: نوع آزمایشگاه، دستگاه‌های مورد استفاده، نوع و بازده DNA پلیمراز مورد استفاده، کارکنان و سطح آموزش و مهارت‌ها، حضور ممانعت کننده‌ها، هدف‌های ژنی متفاوت در عامل مورد شناسایی، سطح بهینه‌سازی آزمون با توجه به مهارت‌ها در آزمایشگاه‌ها، روش های PCR خانگی [1] و شاخص‌های دیگر، باعث شده که در برخی موارد جواب‌های صحیح و قابل تکرار گزارش نشده و فقط برخی از پروتکل‌های چاپ شده در مقالات به طور عملی در آزمایشگاه‌ها تکرار شود (۲- ۸).

با وجود حساسیت بالا در PCR، موانع و مسایلی نیز در تکثیر قطعات DNA وجود دارد که به عنوان یک سد، مانع از تکثیر و ایجاد جواب‌های منفی کاذب می‌شود. حضور مواد بازدارنده در نمونه‌های مرضی مانند مایع پلور [2]، مایع مغزی/ نخاعی [3]، خلط [4]، خون محیطی [5]، و دیگر نمونه‌ها مانع از تکثیر می‌شود (۹- ۱۱). روش‌های متعددی برای نظارت بر حضور مواد ممانعت کننده در PCR گزارش شده است (۱۲- ۱۴) که مهم‌ترین آن‌ها به کارگیری اینترنال کنترل در یک آزمون PCR است.

در بیشتر مقالات چاپ شده در زمینه تشخیص PCR عوامل عفونی، اینترنال کنترل تکثیری [6] (IAC) وجود ندارد. بر خلاف کنترل مثبت، اینترنال کنترل بیشتر یک توالی DNA غیر هدف حاضر در نمونه است که به طور هم‌زمان با توالی هدف تکثیر می‌شود. در یک PCR بدون IAC، یک پاسخ منفی یعنی این‌که توالی هدف حضور ندارد. اما، آن می‌تواند در عین حال به معنای این باشد که واکنش به علتی مانند: اختلال در دستگاه ترموسایکلر، مخلوط PCR غلط، فعالیت آنزیم DNA پلیمراز، یا حداقل حضور مواد بازدارنده در ماتریکس نمونه، ممانعت شده است. به طور بر عکس، در یک PCR با IAC، یک سیگنال کنترل همیشه تولید می‌شود که تکثیر اینترنال کنترل است. این کنترل داخلی حتی در عدم حضور توالی هدف مورد آزمایش تکثیر می‌شود و اگر تکثیر نشود یعنی اشکالی در تکثیر (به علت‌های متفاوت) وجود دارد (۲ و ۶- ۸).

هدف از پژوهش حاضر، معرفی استراتژی سریع و ساده برای طراحی و ساخت اینترنال کنترل آزمون PCR تشخیصی، برای عواملی مانند *ویروس هپاتیت B* (HBV) – ویروس *هرپس سیمپلکس ۱ و ۲* (HSV) – *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (MTB) – *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* (Cne) – جنس *سالمونلا* (*Sal.* sp) – و جنس *مایکوپلاسما* (*M.* sp) به روش رقابتی و از طریق PCR-Cloning، و همین‌طور تعیین حداقل و حداکثر حساسیت آزمون به جهت حد تشخیص LOD [7] است.

مواد و روش‌ها

تهیه سوش‌های استاندارد: در این پژوهش گونه‌های متعلق به مولیکوتس به کار رفته برای آزمون PCR *مایکوپلاسما پنومونیه*[۸] و جنس *مایکوپلاسما*[۹] عبارت بودند از: *مایکوپلاسما پنومونیه* (NCTC 10119)، *مایکوپلاسما گالیسپتیکوم*[۱۰] (رازی ۱۳۵۵)، *مایکوپلاسما گالیناروم*[۱۱] (رازی ۱۳۵۰ و ۱۳۴۶)، *مایکوپلاسما اویاپنومونیه*[۱۲] (رازی ۱۳۶۴)، *مایکوپلاسما آگالاکتیا*[۱۳] (رازی ۱۳۴۳)، *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم*[۱۴] (رازی ۱۳۶۹) *مایکوپلاسما آرجینینی*[۱۵]، *مایکوپلاسما هیورینیس*[۱۶]، *مایکوپلاسما ارال*[۱۷]، *مایکوپلاسما سینوویه*[۱۸] و *اکول پلاسما لیدلاوی*[۱۹] (تهیه شده از انستیتو رازی). سوش استاندارد *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*[۲۰] از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به شکل لیوفلیزه (ATCC number: 13690) تهیه ودر محیط کشت yeast malt agar حاوی کلرامفنیکل به میزان ۴۰۰ (میلی‌گرم در لیتر) به طور اسلنت کشت و سپس، روی آن با محیط کشت سابورو دکستروز براث پوشانده شد. لوله‌ها به مدت ۷۲ ساعت تا یک هفته در دمای ۳۴ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. ایجاد کلونی روی سطح شیبدار و کدورت در بخش مایع نشانه رشد مناسب بود.

سوش استاندارد باسیل سل[۲۱] از آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی بیمارستان مسیح دانشوری تهیه شد. همین‌طور DNA چندین گونه مختلف *مایکوباکتریوم* مانند *مایکوباکتریوم چلونی–آویوم–گوردونه–اینتراسلولار–سزولگای* و *گزنوپی* نیز از دکتر جیم ورنگرن و دکتر سیون هافنر از انستیتو کنترل بیماری‌های عفونی سوئد[۲۲] تهیه شد. *سالمونلا تیفی موریوم* ATCC 14028 و چندین نوع *سالمونلای* دیگر و همین‌طور *ویروس هپاتیت B* و *ویروس هرپس سیمپلکس I* و *II* نیز از بخش ویروس‌شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه، از کیت استخراج DNA تولید شرکت سیناکلون بنام DNG با شماره کاتالوگ (DN8118C) استفاده شد. مراحل کاری به طور خلاصه عبارت بود از: قرار دادن محلول DNG Plus در ۳۷ درجه و آرام تکان دادن آن، تا به شکل یک محلول هم دما و یکنواخت در آید. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون عامل با ۴۰۰ میکرولیترمحلول DNG Plus مخلوط و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس شد. نمونه در این مرحله باید به طور کامل به شکل سوسپانسیون درآید و هر گونه تجمع و یا توده‌ای، تخریب شده و از بین رود. سپس، ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه شده، ۱۰ مرتبه وارونه و متعاقب آن، لوله‌ها در فریزر به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. سپس، در ۱۲۰۰۰rpm برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به آرامی خالی و تیوب به طور واژگون بر روی دستمال کاغذی قرار داده شد. ۱ میلی‌لیتر اتانول سرد ۷۵ درصد به رسوب اضافه، به مدت ۳ تا ۵ ثانیه ورتکس و سپس، در دور ۱۲۰۰۰ rpm برای مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. اتانول کاملاً خالی و رسوب در ۶۵ درجه خشک شد. رسوب که محتوی DNA است در ۵۰ میکرولیترآب همراه با تکان دادن آرام و قرار دادن در ۶۵ درجه خوب حل شد.

پرایمرها و شرایط PCR: بهینه نمودن آزمون PCR برای تشخیص *HBV–HSV–MTB–MPN–Cne–Sal. sp–* و *M. sp*، از طریق بهینه نمودن غلظت اجزایی که در واکنش PCR به کار می‌روند و همچنین، طراحی و

انتخاب برنامه حرارتی مناسب در دستگاه ترموسایکلر انجام شد (جدول ۱ و ۲). پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*، از مطالعات انجام گرفته توسط لویتز[۲۳] در سال ۱۹۹۱ و وون چانگ[۲۴] در سال ۱۹۹۲ به دست آمده‌اند، که توالی آن‌ها در جدول ۱ آمده است (۱۵- ۱۸). پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص ویروس هپاتیت B، پرایمرهای مخصوص ژن آنتی‌ژن سطحی این ویروس HBS است (۱۹- ۲۱). برای تشخیص HSV از ژن DNA-Polymerase استفاده و پرایمرها طراحی شد (۲۲). در تشخیص MTB ژن هدف IS6110 (۲۳- ۲۷)، و در *مایکوپلاسما پنومونیه* P1 adhesin (۲۸)، در جنس *مایکوپلاسما* *16S rRNA* (۲۹- ۳۰) و در جنس *سالمونلا* ژن invA (۳۱) در نظر گرفته شد.

واکنش PCR با مقادیر زیر انجام شد: ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی با غلظت نهایی ۰/۴ میلی مول (یک میکرولیتر از غلظت ۱۰ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$) (از غلظت ۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی مولار) و ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (بیوفلوکس)، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تکثیر شد. پروفایل حرارتی هر آزمون در جدول ۲ آمده است. پس از به پایان رسیدن سیکل‌های حرارتی، برای مشاهده DNA تکثیر شده از روش الکتروفورز استفاده شد. محصولات PCR در کنار سایز مارکر و کنترل‌ها، در ژل آگاروز ۱/۵ درصد و با استفاده از سایبرگرین و نور UV در دستگاه ژل داکومنتیشن بررسی شد.

حساسیت و ویژگی: برای بررسی حساسیت جفت پرایمرهای مورد استفاده، رقت‌هایی از سوسپانسیون عوامل با تعداد مشخص تهیه شد و استخراج DNA از این رقت‌ها به روش DNG-Plus (سیناکلون) انجام و سپس، آزمون PCR برای رقت‌های تهیه شده انجام شد. آزمون ویژگی هم با استفاده از گونه‌های مختلف آزمایش و ارزیابی شدند.

ساخت اینترنال کنترل (IC): برای ساخت اینترنال کنترل رقابتی به روش PCR-Cloning، پرایمرهای جلویی و عقبی هر عامل در بخش '۵ پرایمرهای ژن کینتوپلاست لیشمانیا (۳۲- ۳۳) با اندازه محصول ۶۲۰ جفت باز، به شکل دم (Tail) طراحی و سنتز شد (جدول ۱).

برای انجام واکنش PCR برای تکثیر قطعه اینترنال کنترل، ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده لیشمانیا با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی IC با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومول، ۲/۵ میکرولیتر از بافر X PCR۱۰، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$) (از غلظت ۵۰ میلی‌مولار)، ۰/ ۵ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مولار) و ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیترتکثیر شد. چرخه‌های حرارتی شامل ۳۵ سیکل متوالی (شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱دقیقه) و یک سیکل پلیمریزاسیون نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه بود. پس از به پایان رسیدن سیکل‌های حرارتی، برای مشاهده DNA تکثیر شده از روش الکتروفورز استفاده شد. قطعه حاصل با پلاسمید pTZ57R کمپانی فرمنتاس به مدت ۶۰ دقیقه در ۲۲ درجه سانتی‌گراد لایگیت و سپس، در باکتری *اشریشیا کلی* JM107

ترانسفورم و کانستراکت حاصل از طریق غربال‌گری سفید/ آبی [۲۵] در محیط حاوی آمپی‌سیلین، X-GAL و IPTG انتخاب شد. کلون‌های مناسب از طریق استخراج پلاسمید با کیت استخراج پلاسمید (Thermo scientific Inc.) و آزمون PCR، تأیید شدند.

کلونینگ محصول PCR و اینترنال کنترل: پس از خالص‌سازی محصولات PCR و ICها که در جدول ۱ آمده است، با استفاده از کیت T/A cloning کمپانی Thermo scientific، محصولات PCR در وکتور pTZ57/R کلون شدند. پلاسمیدهای حاوی محصولات PCR حاصل با GeneJET Plasmid Miniprep Kit (K0502) کمپانی Thermo Scientific استخراج شد. سپس، با روش PCR، پلاسمیدهای حاوی محصولاتPCR و ICها با استفاده از پرایمرهای تشخیصی تأیید شدند.

تعیین غلظت ایده آل IC: هدف از تعریف غلظت DNA ایده آل IC برای PCR، تأیید غلظت بهینه IC است که با ژن هدف، کم‌ترین رقابت در تکثیر را انجام دهد (۹). برای به دست آوردن غلظت بهینه، غلظت‌های متفاوت پلاسمید حاویIC و DNAهای استاندارد آزمایش شد. غلظت DNA عوامل مورد استفاده در آزمون و همچنین IC، به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومترتعیین شد. رقت‌های حاوی مقادیر DNA متفاوت عوامل میکروبی که از طریق رقت‌های سری [۲۶] تهیه شده بود با مقادیر ثابت IC، آزمون شد. برای PCR، ۵ میکرولیتر از DNA عامل میکروبی با ۱ میکرولیتر از IC مخلوط و در میکس PCR استفاده شد.

توالی‌یابی: تعیین توالی DNAها در دو جهت با استفاده از روش ختم زنجیره [۲۷] و به وسیله کمپانی ماکروژن کره انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص DNA عوامل و تکثیر اینترنال کنترل

عامل	آغازگر	توالی (5´.....3´)	ژن هدف	سایز محصول (جفت باز)
کریپتوکوکوس نئوفرمنس	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	Internal transcribed spacer (ITS) regions	۴۱۵
	CN4	ATC ACC TTC CCA CTA ACA CAT T		
	ICFCneo	TCC GTA GGT GAA CCT GCG GTCgCAgAACgCCCCTACC		۶۶۱
	ICRCneo	ATC ACC TTC CCA CTA ACA CAT TAGGGGTTGGTGTAAAATAGGC		
ویروس هپاتیت B	HBVF	CAA ggT ATg TTg CCC gTT Tg	HBS	۲۶۲
	HBVR	AAA gCC CTg CgA ACC ACT gA		
	ICFHBV	CAA ggT ATg TTg CCC gTT TgT CgC AgA ACg CCC CTA CC		۶۶۰
	ICRHBV	AAA gCC CTg CgA ACC ACT gAA ggg gTT ggT gTA AAA TAg gC		
هرپس سیمپلکس ویروس	HSV-F	ACC TAC Cgg CAT ACA AgC TCA	DNA polymerase	۴۵۴
	HSV-R	AAg Tgg CTC Tgg CCT ATg TCC		
	ICFHSV	ACC TAC Cgg CAT ACA AgC TCATCg CAg AAC gCC CCT ACC		۶۶۲
	ICRHSV	AAg Tgg CTC Tgg CCT ATg TCCAgg ggT Tgg TgT AAA ATA ggC		
مایکوباکتریوم توبرکلوزیس	MTBF	CgT gAg ggC ATC gAg gTg gC	IS61110	۲۴۵
	MTBR	gCg TAg gCg TCg gTg ACA AA		
	ICFMTB	CgT gAg ggC ATC gAg gTg gCT CgC AgA ACg CCC CTA CC		۶۶۰
	IICRMTB	gCg TAg gCg TCg gTg ACA AAA ggg gTT ggT gTA AAA TAg gC		

ادامه جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص DNA عوامل و تکثیر اینترنال کنترل

۳۴۵	P1 adhesin	Agg CTC Agg TCA ATC Tgg CgT ggA	MPNF	*مایکوپلاسما پنومونیه*
		ggA TCA AAC AgA TCg gTg ACT ggg T	MPNR	
۶۶۹		Agg CTC Agg TCA ATC Tgg CgT ggA TCg CAg AAC gCC CCT ACC	ICFMPN	
		ggA TCA AAC AgA TCg gTg ACT ggg TAg ggg TTg gTg TAA AAT Agg C	ICRMPN	
۲۷۲	*16 S rRNA*	ggg AgC AAA CAg gAT TAg ATA CCC T	MspF	*جنس مایکوپلاسما*
		TgC ACC ATC TgT CAC TCT gTT AAC CTC	MspR	
۶۷۲		ggg AgC AAA CAg gAT TAg ATA CCC TTC gCA gAA CgC CCC TAC C	ICFMsp	
		TgC ACC ATC TgT CAC TCT gTT AAC CTC Agg ggT Tgg TgT AAA ATA ggC	ICRMsp	
۲۸۴	invA	gTg AAA TTA TCg CCA CgT TCg ggC AA	SalspF	*جنس سالمونلا*
		TCA TCg CAC CgT CAA Agg AAC C	SalspR	
۶۶۸		gTg AAA TTA TCg CCA CgT TCg ggC AAT CgC AgA ACg CCC CTA CC	ICFSal	
		TCA TCg CAC CgT CAA Agg AAC CAg ggg TTg gTg TAA AAT Agg C	ICRSal	

جدول ۲- پروفایل حرارتی و سایز محصولات بعد از تکثیر

عامل	پروفایل حرارتی	سایزمحصول (جفتباز)
کریپتوکوکوس نئوفرمنس	Pre-Denaturation ۶ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد *Denaturation* ۳۰ ثانیه، ۹۴ درجه سانتی گراد *Annealing* ۳۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی گراد، ۴۰ چرخه *Extension* ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد Final Extension ۱۰ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد	۴۱۵
B ویروس هپاتیت	*Denaturation* ۴۰ ثانیه، ۹۴ درجه سانتی گراد *Annealing* ۴۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد، ۴۰ چرخه *Extension* ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد	۲۶۲
مایکوباکتریوم توبرکلوزیس	Pre-Denaturation ۵ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد *Denaturation* ۴۵ ثانیه، ۹۴ درجه سانتی گراد *Anneal. & Exten.* ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد، ۴۰ چرخه	۲۴۵
مایکوپلاسما پنومونیه	Pre-Denaturation ۲ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد *Denaturation* ۳۰ ثانیه، ۹۴ درجه سانتی گراد *Annealing* ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه سانتی گراد، ۴۰ چرخه *Extension* ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد Final Extension ۷ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد	۳۴۵
جنس مایکوپلاسما	Pre-Denaturation ۲ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد *Denaturation* ۳۰ ثانیه، ۹۴ درجه سانتی گراد *Annealing* ۲۰ ثانیه، ۷۰ درجه سانتی گراد، ۴۰ چرخه *Extension* ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد Final Extension ۷ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد	۲۷۲
جنس سالمونلا	Pre-Denaturation ۱ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی گراد *Denaturation* ۳۰ ثانیه، ۹۴ درجه سانتی گراد *Annealing* ۳۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی گراد، ۳۵ چرخه *Extension* ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد Final Extension ۵ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی گراد	۲۸۴

نتایج

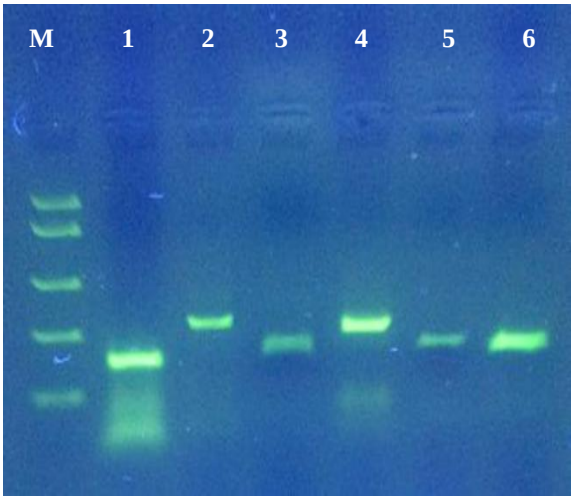
آزمون‌های PCR بر روی DNA استخراج شده از عوامل میکروبی ویروس هپاتیت B، هرپس سیمپلکس ویروس، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، *مایکوپلاسما پنومونیه*، *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*، جنس *مایکوپلاسما* و جنس *سالمونلا* بهینه شد. در شکل ۱ محصول آزمون تشخیص PCR عوامل یاد شده، مشاهده می‌شود. ترادف محصولات تکثیر شده هرآزمون PCR، از طریق روش ختم زنجیره تأیید شد.

در آزمون ویژگی، هیچ محصول نا خواسته‌ای با DNA گونه‌های مختلف مورد آزمون دیده نشد (شکل ۲). تعداد DNA اولیه نمونه برای حساسیت از طریق Optical Density در ۲۶۰ نانومتر و با استفاده از فرمول تعداد کپی ژنوم(GCN) [۲۸] محاسبه و از طریق تهیه رقت‌های سری از DNA میکروارگانیسم‌های مورد آزمون، و انجام آزمون PCR، حد تشخیص (حساسیت) در حد حداقل ۱۰ کپی در نمونه‌های مورد آزمایش به دست آمد.

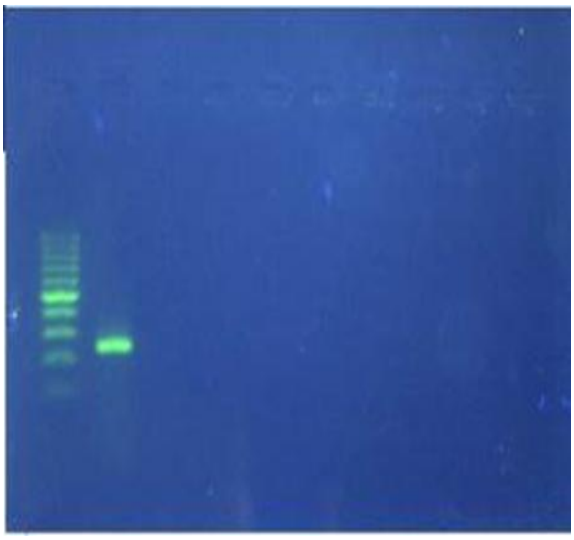
قطعه‌های اینترنال کنترل بعد از تکثیر، کلون و توسط روش PCR تأیید شد. در شکل ۳ محصول تکثیر شده اینترنال کنترل ویروس هرپس سیمپلکس با اندازه ۶۶۲ bp در کنار سایز مارکر فرمنتاس با کاتالوگ شماره ۱۱۱۳ و همچنین، محصول PCR با اندازه ۴۵۴ جفت بازی، مشاهده می‌شود.

در شکل ۴ نتایج PCR اینترنال کنترل و آزمون آن با مقادیر متفاوت DNA عامل مشاهده می‌شود. غلظت ایده‌ال IC برای آزمون PCR، در مورد نمونه‌های مختلف مقدار ۵ فمتوگرم در هر واکنش به دست آمد. این غلظت برای آزمون با نمونه‌های فرضی استفاده شد. برای استاندارد کردن IC، غلظت به کار رفته آن اهمیت بسیار بالایی دارد، زیرا حضور مقادیر بالای IC، موجب رقابت با الگوی DNA ژنومیک شده و نتیجه منفی کاذب ایجاد می‌شود. بنابراین، کاربست غلظت ۵ فمتوگرم از IC با ۵ میکرولیتر از DNA نمونه‌های فرضی استخراج شده موجب اثرات رقابتی نمی‌شود.

رقابت بین محصول PCR و توالی‌های IC به وسیله کوآمپلیفیکاسیون رقت‌های متفاوت بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از حجم ۵ میکرولیتر DNA کنترل مثبت و یا نمونه‌های مورد آزمایش (نمونه‌های مرضی) مناسب است. اضافه کردن حجم بیشتر از کنترل مثبت و یا نمونه‌های مورد آزمون، موجب رقابت با IC می‌شود. بنابراین، اگر هم از قبل غلظت DNA در نمونه‌ای مشخص نباشد، ۵ میکرولیتر حجم مناسب برای تشخیص در PCR است.

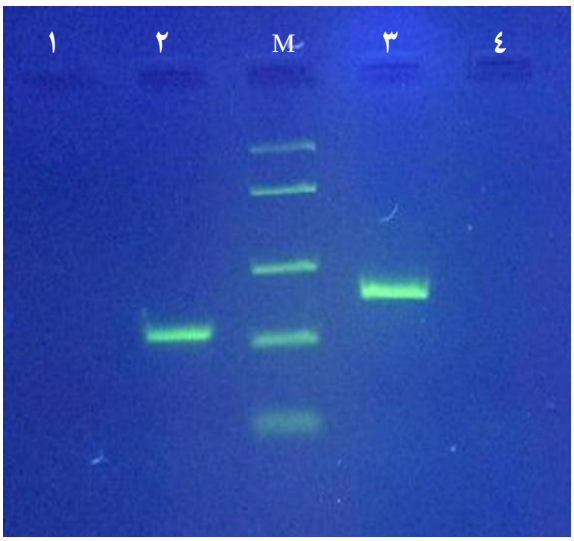


شکل ۱- آزمون اپتیمایز شده PCR برای سوش‌های استاندارد
۱: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ۲۴۵ bp. ۲: ویروس هرپس سیمپلکس ۴۵۴ bp. ۳: ویروس هپاتیت B ۲۶۲ bp. ۴: کریپتوکوکوس نئوفورمنس ۴۱۵ bp. ۵: جنس *سالمونلا* ۲۸۴ bp. ۶: جنس مایکوپلاسما ۲۷۲ bp. لاین M: سایز مارکر فرمنتاس با سایز قطعات از پایین به بالا ۱۰۰- ۴۰۰- ۸۵۰- ۲۰۰۰- ۵۰۰۰ جفت باز (cat no. 1113).



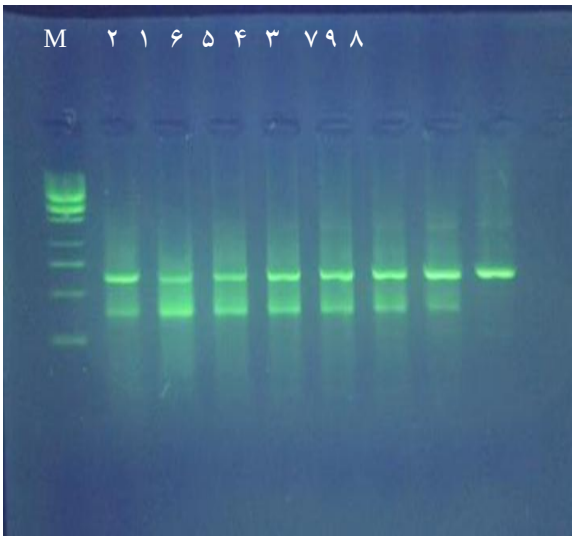
شکل ۲- تعیین اختصاصیت آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*.

لاین M: سایز مارکر DNA ladder 100bp. لاین ۱: *M. tuberculosis* لاین ۲: *M. chelonae* لاین ۳: *M. fortuitum* لاین ۴: *M. xenopi* لاین ۵: *M. kansasii* لاین ۶: *M. szulgai* لاین ۷: *M. intracellulare* لاین ۸: *M. avium* لاین ۹: *M. gordonae*



شکل ۳- اینترنال کنترل کلون و تکثیر شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

لاین ۱ و ۴: کنترل منفی. لاین ۲: محصول PCR ویروس هرپس سیمپلکس (۴۵۴ bp). لاین ۳: محصول اینترنال کنترل HSV ۶۶۲ bp لاین M: سایز مارکر فرمنتاس (cat no. 1113).



شکل ۴- الکتروفورز نتایج PCR با تعداد مشخص DNA *مایکوپلاسما پنومونیه*.

۱: سایز مارکر 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific). ۱: کنترل مثبت (حاوی ۱۰۰۰ عدد پلاسمید حاوی اینترنال کنترل و ۱۰۰۰ DNA *مایکوپلاسما پنومونیه*). ۲: تعداد ۱۰ میلیون DNA از عامل. ۳: تعداد ۱ میلیون. ۴: تعداد صد هزار. ۵: تعداد ده هزار. ۶: تعداد هزار. ۷: تعداد ۱۰۰ عدد DNA *مایکوپلاسما پنومونیه*. ۸: DNA تعداد ۱۰ عدد *مایکوپلاسما پنومونیه*. ۹: کنترل منفی

بحث و نتیجه‌گیری

روش‌های تکثیری همچون PCR، روش‌های دهه ۸۰ و ۹۰ میلادی هستند که به عنوان نقطه عطفی در زیست‌شناسی به مفهوم عام و روش‌های تکثیری به مفهوم خاص مطرح شده‌اند. مشکل اساسی بسیاری از روش های PCR شناخته شده حتی آن‌هایی که امروزه استفاده می‌شود، نداشتن یک کنترل داخلی است. بر خلاف کنترل مثبت خارجی، کنترل داخلی یک توالی از توالی هدف از DNA موجود در لوله است که به طور هم‌زمان با توالی هدف تکثیر می‌شود. در یک PCR بدون کنترل داخلی، یک پاسخ منفی (بدون باند یا سیگنال) می‌تواند به معنای نبود توالی هدف در واکنش باشد، اما همچنین ممکن است به معنی باز

داشته شدن واکنش، ناشی از عملکرد نا صحیح ترموسایکلر، مخلوط نا صحیح PCR، فعالیت ضعیف DNA پلیمراز و یا حضور مواد باز دارنده در نمونه باشد. بر عکس در یک PCR که دارای کنترل داخلی است، همیشه یک Signal control، حتی هنگامی که توالی هدف وجود ندارد تولید می‌شود، این امر می‌تواند عدم موفقیت PCR را نمایان کند (۳۴).

با به کارگیری اینترنال کنترل در آزمون‌های PCR نتیجه آزمون به این شکل تفسیر می‌شود: نمونه‌هایی که دارای سیگنال هدف هستند، بدون توجه به نتیجه اینترنال کنترل، مثبت تفسیر می‌شود. نمونه‌هایی که فاقد سیگنال هدف هستند، منفی تلقی شده، هرچند سیگنال اینترنال کنترل آن‌ها قابل ردیابی نباشد. نمونه‌هایی که برای هر دو سیگنال هدف و اینترنال کنترل منفی هستند به عنوان نمونه‌های مخدوش (مهار شده) تفسیر می‌شوند (۳۵).

دو استراتژی کلی برای ساخت IC وجود دارد (۲ و ۶): ۱- ساخت اینترنال کنترل رقابتی [۲۹] ۲- ساخت اینترنال کنترل غیر رقابتی [۳۰]. با استفاده از روش پرایمر مرکب، هدف و اینترنال کنترل با یک جفت پرایمر، درهمان شرایط (شرایط یکسان) و درهمان لوله (در یک لوله) تکثیر می‌شوند. دراین استراتژی، همیشه رقابت بین DNA هدف و اینترنال کنترل وجود دارد. بنابراین، میزان اینترنال کنترل برای حد شناسایی یک نکته حساس و مهم است. باید توجه داشت که میزان تکثیر دو قطعه DNA متفاوت به وسیله یک جفت پرایمر می‌تواند منتج به ممانعت یا تشدید تکثیر یکی از دو محصول شود. این امر به ۱) میزان مولار [۳۱] ۲) طول محصولات تکثیری و ۳) ترادف و ساختار ثانویه قطعات DNA و شاخص‌های دیگر وابسته است. رقابت اینترنال کنترل می‌تواند موجب کاهش تکثیر و کم شدن بازده محصول PCR و متعاقب آن کاهش حد شناسایی شود. بنابراین، یکی از مهم‌ترین شاخص‌هایی که باید در نظر گرفته شود، غلظت اینترنال کنترل در یک آزمون PCR است، زیرا زیادی DNA اینترنال کنترل در یک آزمون PCR موجب رقابت آن با DNA هدف و کاهش محصول هدف می‌شود و این خود می‌تواند موجب نتایج منفی کاذب شود. در پژوهش حاضر، به طور هوشمندانه حد شناسایی برای همه ۷ آزمون PCR همراه با ICهای ساخته شده، تعیین شد. افزون بر این، اگر غلظت بالای اینترنال کنترل انتخاب شود عوامل ممانعت کننده در آزمون که موجب نتایج منفی کاذب می‌شوند؛ به ویژه در زمانی که غلظت DNA هدف کم است، شناسایی نمی‌شوند. دومین شاخص مهم، سایز اینترنال کنترل است. افزایش سایز یک هدف نسبت به دیگری در تئوری، موجب تمایل واکنش به سمت محصول PCR هدف کوچک‌تر می‌شود. بسیاری از پژوهشگران بدون توجه به سایز اینترنال کنترل، بیشتر رقابت توالی هدف در PCR با اینترنال کنترل را به طور کلی مورد توجه قرار داده‌اند (۳۶- ۳۹).

برایت ول [۳۲] (۴۰) و عبدالموجود [۳۳] (۴۱) گزارش کرده اند که سایز اینترنال کنترل کوچکتر از ۵۰۰ bp، تاثیری بر روی حساسیت PCR ندارد. بنابراین، اینترنال بزرگتر از محصول PCR هدف، کم کم موجب رقابت می‌شود. البته این موضوع در این مطالعه روی *M. sp* و *–HBV–HSV–MTB–MPN–Cne–Sal. sp* بررسی و کم‌ترین تأثیر بر روی آزمون‌ها مشاهده شد.

اگر DNA هدف تکثیر شود اما IC تکثیر نشود، فرض بر این است که میزان DNA هدف بسیار بیشتر از

DNA اینترنال کنترل است. بنابراین، در این شرایط اگر نتایج مثبت مشاهده شود معتبر است، زیرا تکثیر اینترنال کنترل غیر ضروری است. اگر هم DNA هدف و هم IC تکثیر نشوند فرض بر این است که عامل ممانعت کننده‌ای موجب عدم تکثیر شده است و آن آزمون برای نمونه، معتبر [۳۴] نیست. بنابراین، در این شرایط مهم‌ترین حد کاهش، ناشی از رقابت اینترنال کنترل است.

در استراتژی غیررقابتی، پرایمرهای هدف و اینترنال کنترل متفاوتند (۲ و ۶- ۷). این استراتژی مستلزم یک آزمون PCR با دو واکنش متفاوت است که به طور همزمان باید جلو روند. وقتی هر دو هدف و IC در این روش تکثیر شوند نتایج معتبر است. هر دو واکنش به وسیله رقابت با پرایمرهای واکنش دیگر تحت تأثیر قرار نمی‌گیرند. پرایمرهای اینترنال کنترل در این استراتژی، بیشتر DNAهای سنتتیک (مانند DNA پلاسمیدی)، یا ژن‌های دیگررا هدف قرار می‌دهند، که در هر میکروارگانیسم حضور دارند و بیشتر هم دارای تعداد کپی بالایی هستند. در این استراتژی، تکثیر IC باید به وسیله یک غلظت کنترل شده پرایمرهای مخصوص اینترنال کنترل، محدود شود تا رقابت هدف و IC برای الیگونوکلئوتیدها و DNA پلیمراز به حداقل برسد. از معایب روش تکثیر غیر رقابتی این نکته است که این روش به طور دقیق تکثیر تارگت اولیه ناشی از تفاوت در ترادف پرایمرها را منعکس نمی‌کند. بنابراین، ترکیب نوکلئوتید و سایز IC باید به دقت مورد توجه قرار گیرد. عیب دوم، این موضوع است که کاربرد IC در شکل غیر رقابتی نیازمند توسعه دو PCR و اپتیمایز کردن آن‌ها در یک شرایط PCR است که می‌تواند باعث کاهش کار یک تکثیر و یا هر دو هدف و IC شود. یک راه برای غلبه بر این مشکل، اپتیمایز کردن سنجش فقط برای تارگت، و اجازه دادن به پیروی کردن واکنش IC از آن است. به علاوه محدود کردن تولید آمپلیکون IC به وسیله طراحی دقیق غلظت پرایمرهای آن در حد مینیمم شرط اساسی و لازم است. از مزایای این روش این موضوع است که در یک لابراتور می‌توان از آن برای تهیه سنجش‌های متفاوت استفاده کرد. زیرا گرایش عمومی در این روش طراحی پرایمرهای IC برای S16 و S23 ریبوزومال RNA است (۲).

بهترین راه برای نگهداری IC این است که آن‌ها را به طور کلون شده در داخل یک پلاسمید و درون میزبانه‌ای باکتریایی که در درون محیط کشت حاوی گلیسیرین و یا به طور لیوفیلیزه نگهداری می‌شوند، حفظ کرد. به این حالت میکروبانک گفته می‌شود. می‌توان IC را به طور آزاد و با غلظت بالا در یک بافر قلیایی مانند بافر TE که باعث پایداری DNA می‌شود نگهداری کرد. IC اگر در آب و یا غلظت‌های پایین نگهداری شود باعث افت و کاهش سیگنال می‌شود. بنابراین، اضافه کردن EDTA برای کیلیت کردن یون‌هایی که موجب واکنش آنزیم‌های تجزیه کننده DNA می‌شوند امری مهم است. اضافه کردن اسیدهای نوکلئیک به عنوان یک کاریر موجب پایداری بیشتر IC می‌شود. نکته دیگر نگهداری DNA در لوله‌های پلاستیکی است. از قرار معلوم DNA به تیوپ‌های پلی پروپیلن متصل و واکنش می‌دهد. این اتصال و واکنش موجب تحریک تغییرات فضایی در DNA شده که بر روی کارآیی تکثیر و دقت و در نهایت، میزان حد تشخیص [۳۵]، اثر می‌گذارد (۴۲).

در پژوهش حاضر کوشش شد از ژنی برای ساخت IC استفاده شود که از اختلاف اندازه مناسبی با ژن هدف برخوردار باشد. در این مطالعه از ژن کینتوپلاست انگل لیشمانیا برای طراحی و ساخت IC به روش رقابتی

و PCR-Cloning استفاده شد که اندازه‌ای برابر با bp ۶۶۰ تا bp ۶۷۲ داشت. به کارگیری ژن کینتوپلاست انگل لیشمانیا برای ساخت اینترنال کنترل در این مطالعه با یک استراتژی هوشمندانه، این مزیت را به همراه داشت که اینترنال کنترل ساخته شده، قابلیت تکثیر در طیف دمایی بهینه برای ژن هدف را دارد. بر اساس همین قابلیت، از این ژن و استراتژی برای ساخت اینترنال کنترل آزمون تشخیص PCR برای هفت عامل استفاده شد تا توانایی‌های این روش ساده و سریع، نمایان شود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس برای فراهم نمودن هزینه پژوهش حاضر، کارکنان محترم موسسه دانش بنیان ایرانیان ژن فناور برای همکاری‌های علمی و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی و همچنین، از دکتر جیم ورنگرن[۳۶] و سیون هافنر[۳۷] برای تهیه non-*Mycobacterial* species تشکر و قدردانی می‌کنند.

References

(1) Shahhosseiny MH., Tehrani R. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Ed 2. Shahre Ghods: Islamic Azad University; 2011: 89- 105.

(2) Hoorfar j., Malorny B., Abdulmawjood A., Cook N., Wagner M., Fatch P. Practical considerations in design of internal amplification controls for Diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42 (5): 1863- 8.

(3) *Protocol for the validation of alternative microbiological qualitative methods* 2001. Document NV- DOC. D- 2001 -04 -25 (http://nmkl.org/NordVal/NodVal.htm). NordVal, Oslo, Norway.

(4) *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods* (EN ISO 16140) 2002. European Committee for Standardization, AFNOR; Paris, France.

(5) *Microbiology of food and animal feeding stuffs*. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of foodborne pathogens. General method and specific requirements. 2002. Draft international standard ISO/DIS 22174. DIN, Berlin, Germany. 4. Hoorfar, J. 1999. EU seeking to validate and standardize PCR testing of food pathogens. ASM News (41) 65: 799.

(6) Hoorfar J., and Cook N. Critical aspects of standardization of PCR. *Methods Molecular Biology* 2002; 216 (69): 51- 64.

(7) Malorny B., Tassios PT., Ra°dstro¨m P., Cook N., Wagner M., and Hoorfar J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol*. 2003; 83 (2): 39- 48.

(8) Schoder DA., Schmalwieser G., Schauberger M., Kuhn J., Hoorfar M. Physical characteristics of six new thermocyclers. *Clinical Chemistry* 2003; 49 (43): 960- 3.

(9) Cortez-Herrera E., Sperhacke RD., Becker D., Kritski A., Zaha A., Rosa-Rosetti., ML. Internal control in PCR for *Mycobacterium tuberculosis*: Usefulness and improvement of the diagnosis. Braz. Arch. *Biology and Technology* 2008; 51 (4): 685- 91.

(10) Kolk AHJ., Noordhoek GT., De Leeuw O., Kuijper S., Van Embden JDA. *Mycobacterium smegmatis* strain for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32 (10): 1354- 6.

(11) Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 63(10): 3741- 51.

(12) Brightwell G., Pearce M., Leslie D. Development of internal controls for PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Molecular and Cellular Probes* 1998; 12 (353): 367-77.

(13) Osaki M., Adachin H., Gomyo Y., Yoshida H., Ito H. Detection of *mycobacterial* DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens by duplex polymerase chain reaction: Application to histopathologic diagnosis. *Modern Pathology* 1997. 10 (51): 78- 83.

(14) Picard FJ., Gagnon M., Bernier MR., Parham NJ., Bastien M., Boissinot M., et al. Internal control for nucleic acid testing based on the use of purified *Bacillus atrophaeus sub sp. Globigii* spors. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47 (2): 751-7.

(15) Levitz S. M. The ecology of *Cryptococcus neoformans* and the epidemiology of *Cryptococcosis*. *Review of Infectious Diseases* 1991; 13 (6): 1163- 9.

(16) Kwon-Chung KJ., Edman JC., Wickes BL. Genetic association of mating types and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity* 1992; 60 (6): 602- 5.

(17) Chen J., Varma A., Diaz MR., Litvintseva AP., Wollenberg KK., Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* Strains and Infection in Apparently Immunocompetent Patients, China. *Emerging Infectious Diseases* 2008; 14 (5): 755- 62.

(18) Kwon- Chung KJ., Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Research* 2006; 6 (6): 574- 87.

(19) Pawlotsky JM., Bastiec A., He´zodec Ch., Lonjon I., Darthuy F., Re´mire´ J., et al. Routine detection and quantification of hepatitis B virus DNA in clinical laboratories: performance of three commercial assays. *Journal of Virological Methods* 2000; 85 (34): 11- 21.

(20) Weber B., Berge A. Molecular detection of hepatitis B virus: recent developments. *Journal of Laboratory Medicine* 2005; 29 (1): 33- 43.

(21) Moslemi E., Shahhosseiny MH., Javadi G., Parivar K., Sattari TN., Keyvani-Amini H. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of HBV in Iran. *African Journal of Microbiol Research* 2009; 3 (8): 439- 45.

(22) Bahrami A., Shahhosseiny M.H., Azadmanesh K., Moslemi E., Noormohamadi Z., Jadali F. Optimization of Loop- Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method for detection of herpes simplex virus type 1 and 2. *Scientific Journal of Kurdestan University of Medical Sciences* 2011*;* 16 (59): 56- 63.

(23) Greenaway C., Menzies D., Fanning A., Grewal R., Yuan L., FitzGerald JM. Canadian Collaborative Group in nosocomial Transmission of Tuberculosis. Delay in diagnosis among hospitalized patients with active *tuberculosis* predictors and outcomes. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine* 2002; (165): 927- 33.

(24) Aryan E., Makvandi M., Farajzadeh A., Huygen K., Bifani P., Mousavi SL., et al. A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology Research* 2010; 165 (5): 211- 20.

(25) Su WJ. Recent advances in the molecular diagnosis of tuberculosis. *Journal of Microbiology and Immunology Infection* 2002; 35 (4): 209- 14.

(26) Green C., Huggett JF. Talbot E., Mwaba P., Reither K., Zumla AI. Rapid diagnosis of tuberculosis through the detection of *mycobacterial* DNA in urine by nucleic acid amplification. *Lancet Infectious Diseases* 2009; 9 (3): 505- 11.

(27) Kohan L., Shahhosseiny MH., Razavi MR., Parivar K., Moslemi E., Verngren J. Evaluation of loop mediated isothermal amplification for diagnosis of

Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10 (26): 5096- 101.

(28) Shahhosseiny MH., Mardani M., Hosseini Z., Khoramkhorshid HR., Rahimi AA., Vande-yusefi J. Comparison of PCR and culture tests for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infections. *Journal of Zanjan University of Medical Sciences & Health Services* 2006; 14 (56): 12- 23.

(29) Shahhosseiny MH., Hosseini Z., Khoramkhorshid HR., Azari S., Shokrgozar MA. Rapid and sensitive detection of Mollicutes in cell culture by polymerase chain reaction. *Journal of Basic Microbiology* 2010; 50 (56): 171- 8.

(30) Shahhosseiny MH., Gharibdust F., Allahyari E., Khoramkhorshid HR., Vande-Yusefi J. Detection of Mycoplasmal DNA in rheumatoid arthritis patients serum by PCR. *Journal of Medical Council of Islamic Republic of IRAN* 2007; 25 (2): 178- 91.

(31) Soltani-Banavandi MJ., Shahhosseiny MH., Shahbazzadeh V., Karimi H., Mirzahosseiny F., Mahboudi D., et al. Selective amplification of prt., tyV and invA genes by multiplex PCR. *Iranian Biomedical Journal* 2005; 9 (3): 135- 8.

(32) Mahboudi F., Abolhassan M., Yaran M., Mobtaker H., Azizi M. Identification and differentiation of Iranian *Leishmania* species by PCR amplification of kDNA. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2001; 33 (8): 596- 8.

(33) Mahboudi F., Abolhassani M., Tehrani S.R., Azimi M., Asmar M. Differentiation of old and new world *leishmania* species at complex and species levels by PCR. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2002; 34 (10): 756- 8.

(34) Burkardt H.J. Standardization and Quality control of PCR analyses. *Clinical Chemistry Laboratory Medicine* 2000; 38 (2): 87- 91.

(35) Sachadyn P., Kur J. The construction and use of a PCR internal control. *Molecular and Cellular Probes* 1998; 12 (5): 259- 62.

(36) Siebert P.D., W. Larrick J. Competitive PCR. *Nature* 1992; 359 (26): 557- 8.

(37) Rosenstraus M., Wang Z., Chang S.Y., DeBonville D., Spadoro J.P. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *Journal of clinical and Microbilogy*1993; 36 (8): 191- 7.

(38) Ra dstro¨m P., fstro¨m C. Lo., Venklev M., Knutsson R., Wolffs P. Strategies for overcoming PCR inhibition, In C. W. Diefenbach and G.S. Dveksler (ed.), PCR primer: a laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, N. Y. 2003. P. 149- 61.

(39) Lu¨beck P.S., Wolffs P., Ra dstro m P., Hoorfar J. Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant campylobacters: assay development and analytical validation. *Apply Environmental Microbiology* 2003; 69 (2): 5664- 69.

(40) Brightwell G., Pearce M., Leslie D. Development of internal controls for PCR detection of *Bacillus anthracis. Molecular and Cellular Probes* 1998; 12 (22): 367- 77.

(41) Abdulmawjood A., Roth S., Bu lte M. Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coliO157* by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 2002; 16 (5): 335- 9.

(42) Belotserkovskii B P., Johnston BH. Polypropylene tube surfaces may include denaturation and multimerisation of DNA. *Science* 2003; 271 (42): 222- 3.

---

[1]- In house PCR
[2]- Pleural fluid
[3]- Cerebrospinal fluid
[4]- Sputum
[5]- Peripheral Blood
[6]- Internal Amplification Control (IAC)

[7]- Limit Of Detection (LOD)
[8]- *Mycoplasma pneumoniae*
[9]- *Mycoplasma* spp
[10]- *Mycoplasma gallisepticum*
[11]- *Mycoplasma gallinarum*
[12]- *Mycoplasma oviapneumoniae*
[13]- *Mycoplasma agalactiae*
[14]- *Ureaplasma urealyticum*
[15]- *Mycoplasma arginini*
[16]- *Mycoplasma hyorinis*
[17]- *Mycoplasma oral*
[18]- *Mycoplasma* synoviae
[19]- *Acholplasma laidlawii*
[20]- *Cryptococcus neoformanse*
[21]- *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv
[22]-Swedish control institute for Infection Disease
[23]- Levitz
[24]- Kwon Chung
[25]- Blue/White Screening
[26]- serial dilution
[27]- Dideoxy Chain Termination
[28]-Genome Copy Number
[29]- Competition IAC
[30]- Non-competition IAC
[31]- Molar Ration
[32]- Brightwell
[33]- Abdulmawjood
[34]- Valid
[35]- Detection limit
[36]- Jim Werngren, Swedish Institute for Infectious Disease Control
[37]- Sven Hoffner, Swedish Institute for Infectious Disease Control

Standardization of diagnostic PCR by Internal Amplification Control

Mohammad Hassan Shahhosseiny *
Associated Professor of Biotechnology, Department of Microbiology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran, shahhosseiny@yahoo.com
Maryam Ghahri
M.Sc. of Microbiology, Iranian Gene Fanavar Institute (IGF), Tehran, Iran, mghahri@rocketmal.com
Mohammad Amin Mahmoudi
M.Sc. of Microbiology, Iranian Gene Fanavar Institute (IGF), Tehran, Iran, apius_mj@yahoo.com
Elham Moslemi
Assistant Professor of Cell and Molecular biology, Biology department, Islamic Azad University, East Tehran Branch, Tehran, iranmoslemi60@yahoo.com

Abstract

Introduction: Different data resulting from non-standard molecular techniques in laboratories were considered as one of the deficiencies about amplification techniques. One of the most important aspects about the articles published in PCR detection until now, is absence of internal control (IC) in majority of them. The aim of this study is to design and develop a simple and rapid method to produce internal control for PCR test and its future application in the routine recognition laboratories.

Materials and methods: To produce competitive internal control in this study, composite primers and PCR-Cloning method were used. We designed and synthesized the forward and reverse primers of PCR diagnostic test of *Hepatitis B virus*(HBV), *Herpes simplex virus*(HSV), *Mycobacterium tuberculosis*(MTB), *Mycoplasma pneumonia*(Mpn), *Cryptococcus neoformans*(Cne), *Salmonella spp* (Sal.sp) and *Mycoplasma spp* (M.sp) in the 5' primers of Leishmania Kintoplast gene in the tail form. The amplified internal controls were attached to pTZ57R and transformed in *E.coli* JM107 bacteria. The minimum IC number was studied using dilution technique and also PCR response spectrum with IC.

Results: The size of HBV, HSV, MTB, MPN, C.ne, Sal.sp, M.sp diagnostic product with specific primers were 262, 454, 245, 345, 415, 284, 272 bp and corresponding internal control also were 660, 662, 660, 669, 661, 668, 672 bp respectively, and desirable difference observed between PCR, IC regarding the size was easy to separate in the gel. The minimum IC was identified to 1000 in each reaction and maximum PCR test sensitivity with IC was provided for entire agents appropriately. Further, in specific test using different agents any unwanted product was not observed too.

Discussion and conclusion: The negative and positive false results in PCR tests are one of the difficulties of this exacting technique which may lead to decrease its performance. Using an internal control in molecular detection method as an internal controlling system, could identify these errors.

Key words: PCR, Internal control, PCR- cloning

* Corresponding author
Received: February 16, 2014 / **Accepted:** October 29, 2014