مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۸، شماره ۲، تابستان ۸۷، صفحات ۶۷ تا ۷۴

Original Article

مقایسه کمی حساسیت NASBA-ELISA و RT-PCR-ELISA در اندازه‌گیری رونویس الحاقی ژن‌های BCR-ABL بیماران مبتلا به CML

علی ناظمی[۱]، مجید صادقی زاده[۲]، مهدی فروزنده مقدم[۳]، غلامرضا جوادی[۴]، مهرداد هاشمی[۵]

[۱] دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
[۲] دانشیار، گروه ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
[۳] دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
[۴] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران
[۵] استادیارگروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) دارای کرموزوم فیلادلفیا هستند. این کروموزوم حاصل جابجایی بازوهای بلند کروموزوم‌های ۹ و۲۲ (q34;q11) بوده که منجر به ایجاد الحاق بین ژنهای BCR و ABL می‌گردد. در این مطالعه، تکنیک‌های RT-PCR و NASBA در تعیین رونویس‌های bcr-abl مقایسه شد.*

روش بررسی: *رونویس‌های الحاقی بطور مصنوعی سنتز و RNA از رده سلولی لوسمیک K562 استخراج گردید. سریال رقت هم از رونویس‌های الحاقی سنتز شده و هم RNA استخراج شده تهیه شد و سپس حساسیت هر دو تکنیک تعیین گردید. محصولات واکنش RT-PCR وNASBA با نسبت برابری به ترتیب با DIG-11-dUTP و DIG-11-UTP نشاندار شد. بدنبال دناتوراسیون، واکنش هیبریداسیون با پروب اختصاصی روی هر دو محصول انجام شد. محصولات در میکروپلیت‌های پوشیده شده با استرپتاویدین انکوبه شد. پس از شستشو پلیت‌ها، آنتی‌دیگ کونژوگه با پراکسیداز اضافه و با استفاده از سوبسترا ATBS فعالیت آنزیمی در طول موج ۴۰۵ نانومتر تعیین شد.*

یافته‌ها: *اختصاصیت هر دو روش یکسان بود، اما حساسیت RT-PCR-ELISA ۱۰۰ برابر بیشتر از روش NASBA-ELISA بود. به عبارتی RT-PCR-ELISA توانست ۱۰۰ پیگوگرم RNA کمتری را نسبت به NASBA-ELISA (۰/۰۰۶ در مقابل ۰/۰۶ پیکوگرم RNA) را شناسایی نماید. هم‌چنین میزان شناسایی سلول‌های لوسمیک توسط این دو روش به ترتیب ۴ و ۴۰۰ سلول بود.*

نتیجه‌گیری: *با وجودی که NASBA به ترمال سیکلر نیازی ندارد، اما حساسیت آن کمتر از روش RT-PCR بوده و نمی‌تواند روش مناسبی برای ارزیابی کمی باشد.*

واژگان کلیدی: *RT-PCR-ELISA، NASBA-ELISA، رونویس‌های bcr-abl*

مقدمه

لوسمی میلوئید مزمن (CML) یک بدخیمی کلونال سلول‌های بنیادی هماتوپیتیک (Hematopoietic stem cells) می‌باشد که منجر به افزایش رده‌های سلولی میلوئید، اریتروئید و مگاکاریوسیت در خون محیطی و هیپرپلازی میلوئید در مغز استخوان می‌گردد. CML با یک ناهنجاری سیتوژنتیکی به نام کروموزوم فیلادلفیا (Ph) همراه می‌باشد. این کروموزوم یک کروموزوم 22 کوتاه شده در نتیجه جابجایی متقابل(q34;q11)t(9;22) است که سبب الحاق ناحیه '3

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، علی ناظمی (**email**: Alinazemy@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۲/۲۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/٤/۱۸

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02]

پروتوانکوژن c-abl (9q34) با ناحیه '5 ژن BCR روی کروموزوم 22q11 می‌گردد. پروتئین‌های الحاقی BCR-ABL متنوعی بر اساس نقطه شکستگی درون ژن BCR ایجاد می‌گردد. تاکنون سه ناحیه شکستگی عمده درون ژن BCR شناسایی شده است (۲، ۱):

- Major-BCR (M-BCR)
- minor-BCR (m-BCR)
- micro-BCR (µ-BCR)

بیش از ۹۵ درصد از بیماران CML دارای ناحیه شکستگی در M-BCR می‌باشند. در مقابل مقر شکستگی در ژن ABL نسبتا ثابت بوده و معمولا پیش از اگزون ۲ (a2) قرار دارد. در این الحاق‌ها، فعالیت تیروزین‌کینازی ژن BCR افزایش می‌یابد و با فسفوریلاسیون پروتئین‌های سیتوپلاسمی منجر به تکثیر سلولی، کاهش وابستگی به فاکتور رشد، مهار آپوپتوزیس و تغییر چسبندگی و سایر اثرات می‌گردد. در حال حاضر از روش‌های سیتوژنتیکی و مولکولی برای شناسایی t(9;22) در بیماران چه در نقطه شروع و چه در دوره درمان یا عود بیماری استفاده می‌گردد. در روش سیتوژنتیکی، آنالیز نوارگذاری کرموزوم‌ها به دلیل اختصاصیت زیاد و توانایی تشخیص نقائص کروموزومی اضافی که در بررسی وضعیت پیشرفت بیماری از اهمیت زیادی برخوردار می باشد، با ارزش است. با این وجود، آنالیز سیتوژنتیکی نیازمند سلول‌های مغز استخوان زنده با بیش از ۱۰ درصد بلاست‌های خون محیطی می‌باشد. در این روش تعداد سلول‌های قابل بررسی، حساسیت کاریوتایپینگ را تعیین می‌نماید و عواملی مانند فیبروزیس که در تهیه مغز استخوان از طریق آسپیراسیون اختلال ایجاد می‌نمایند، سبب کاهش تعداد سلول‌ها و کاهش حساسیت این تکنیک می‌گردند. به هرحال در ۵ درصد موارد CML وقوع t(9;22) از طریق آنالیز سیتوژنتیکی قابل مشاهده نبوده و منجر به تفسیر کاریوتایپینگ منفی کاذب می‌گردد (۶-۳).

روش‌های مولکولی مورد استفاده برای تشخیص این اختلال عبارتند از: ساترن بلاتینگ، FISH، RT-PCR و Real-time PCR، پالس فیلد ژل الکتروفورزیس (PFGE)، Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)، وسترن بلاتینگ (Western Bloting) (۹-۷). یک روش متغیر و جدید برای تکثیر و تشخیص رونویس های bcr-abl، NASBA می‌باشد. در این تکنیک ایزوترمال (بدون نیاز به PCR Thermal cycler) RNA مستقیما در یک واکنش سه آنزیمی شامل avian myeloblastosis virus reverse transcriptase، RNase H و T7 RNA polymerase و دو پرایمر تکثیر می‌گردد. در مرحله اول NASBA، پرایمراول (که حدودا ۴۵ باز طول دارد که ۲۰ باز انتهای `3 آن با انتهای `5 توالی هدف مکمل می‌باشد و مابقی آن توالی مربوط به پروموتور فاژ T7 می‌باشد) با توالی RNA هدف متصل می‌گردد. آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس با استفاده از dNTPs انتهای `3 پرایمر اول را تکثیرکرده و منجر به تولید cDNA می‌گردد. سپس RNase H در هیبرید RNA-DNA مولکول RNA را هیدرولیز می‌نماید. پرایمر دوم (حدودا ۲۰ باز طول دارد و مکمل انتهای `5 توالی هدف می باشد) به cDNA تک‌رشته‌ای متصل می‌گردد. آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس رشته دوم DNA از جمله توالی فاژ T7 را سنتز می‌نماید. پس از دو رشته‌ای شدن، ناحیه پروموتوری آنزیم T7 RNA polymerase نسخ جدید از RNA (بیش از ۱۰۰ نسخه تنها از یک ملکول الگو) را تولید می‌نماید. هر یک از مولکول‌های جدید RNA ،به عنوان الگو برای چرخه تکراری فرایند NASBA بکار می‌رود. در تکنیک NASBA ، ۱۰ تا ۱۰۰ نسخه از RNA در هر مرحله رونویسی تولید می‌شود، به طوری که تنها ۴ تا ۵ دور برای یک تکثیر یک میلیونی (در مقایسه با ۲۰ سیکل واکنش مورد نیاز در PCR) کافی است (۱۰، ۶).

در روش Real-time-NASBA محصول واکنش از طریق پروب‌های نشاندار شده با مواد فلورسنت شناسایی می‌گردد. در حالی که در روش NASBA-ELISA ، محصول حاصل از تکثیر با ملکول Digoxigenin نشاندار می‌گردد که آنها را می‌توان پس از هیبریداسیون با پروب بیوتینه مکمل به توالی هدف از طریق میکروپلیت‌های پوشیده شده با استرپتاویدین و آنتی‌بادی Anti-DIG کونژوگه‌شده با HRP در حضور سوبسترا TMB توسط Reader الایزا شناسایی نمود.

مزیت روش NASBA در سرعت عمل بسیار بالاتر از روش RT-PCR، عدم نیاز به دستگاه ترمال سیکلر PCR و سیستم الکتروفورزیس می‌باشد (۱۱).

پاسخ به درمان را می‌توان با استفاده از سه روش هماتولوژیکی، سیتوژنتیکی و مولکولی اندازه‌گیری نمود. بهبودی هماتولوژیکی با شمارش گلبول‌های خونی و برگشت اندازه طحال به حد نرمال تعیین می‌گردد، درحالی که پاسخ سیتوژنتیکی بوسیله درصد سلولهای +Ph باقیمانده تعیین می‌گردد. شناسایی بهبود بیماری از طریق روش‌های مولکولی از جمله RT-PCR یا NASBA نیز قابل اجرا می‌باشد.

با توجه به مقاومت سلول‌های سرطانی به داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی و هم چنین عود بیماری پس از پیوند مغز استخوان، بررسی حداقل بیماری باقیمانده (MRD)

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02]

پس از درمان دارویی و یا پیوند بسیار حائز اهمیت است. در این رابطه NASBA-ELISA نیمه کمی به دلیل عدم نیازمندی به دستگاه‌های پرهزینه و اجراء بسیار ساده‌تر در آزمایشگاه می‌تواند مورد توجه باشد (۱۲، ۶، ۳).

مواد و روشها

خون کامل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از سه بیمار مبتلا به CML شناسایی شده بر اساس ویژگی‌های هماتولوژیکی که به دو آزمایشگاه محلی در شهرستان رشت و تنکابن مراجعه کرده بودند، با رعایت مسائل اخلاقی و پزشکی تهیه گردید. سلول‌های خونی تک‌هسته‌ای پس از رقیق‌سازی خون با بافر فسفات به نسبت ۲:۱ و قرارگیری روی بالشتکی از محلول فایکول و سانتریفوژ در دور g ۱۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه جدا گردید.

از طرف دیگر، سوسپانسیونی از کشت رده سلولی K562 (سلول حاوی کروموزوم فیلادلفیا با نقطه شکستگی M-BCR) در حدود 10^5 سلول در میلی‌لیتر از بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری گردید.

RNA توتال از ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون تغلیظ شده سلولی بوسیله محلول استخراج RNA سیناژن (RNX) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. رسوب پس از خشک شدن در دمای اتاق در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر عاری از RNase حل گردید.

واکنش RT-PCR به صورت دو مرحله‌ای روی یک میکرولیتر RNA (۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) استخراجی انجام شد. واکنش مرحله اول در حجم ۱۰ میکرولیتر حاوی ۰/۱ میکروگرم RNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم، ۵ میلی‌مول dNTP، ۱۲ واحد RNasin، ۱۰ پیکومول پرایمر T7pc1، ۱۰ DMSO درصد و ۱۰۰ واحد M-Mulv Reverse Transcriptase در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام شد. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای T7pc1 و pc2 در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر محصول واکنش رونویسی معکوس، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x آنزیم، ۵۰ میلی‌مول MgCl2، ۵ میلی‌مول dATP، ۵ میلی‌مول dGTP، ۵ میلی‌مول dCTP، ۴/۵۷ میلی‌مول dTTP ، ۰/۲۵ میلی‌مول DIG/dUTP، ۱۰ پیکومول جفت پرایمرهای T7pc1 و pc2 و ۱/۵ واحد Taq DNA polymerase طبق برنامه زیر انجام گرفت: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، سپس ۴۰ دور شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه.

T7pc1:5′-*AATTAATACGACTCACTATAGGGAGATG GTTTGGGCTTCACACCATTCC-3′*
Pc2: *5′-GTTTCAGAAGCTTCTCCCTG-3′*

در پایان محصول ۴۴۰ جفت بازی روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد.

واکنش NASBA روی یک میکرولیتر RNA استخراجی (۰/۱ میکروگرم در میکرولیتر) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۶/۵ میکرولیتر بافر ۵x آنزیم RT ، ۵ میلی‌مول dNTP، ۲۵ میلی‌مول ATP، ۲۵ میلی‌مول GTP، ۲۵ میلی‌مول CTP، ۲۲ میلی‌مول TTP، ۳ میلی‌مول DIG-11-UTP، ۱۰ درصد DMSO و ۱۰ پیکومول پرایمرهای T7pc1 و pc2 انجام گرفت. ابتدا مخلوط واکنش فوق به مدت ۵ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و سپس تا دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد خنک شد. سپس مخلوط آنزیمی M-Mulv Reverse Transcriptase(RT) ۴۰U، T7 RNA polymerase ۴۰U، ۱۲U RNasin اضافه و به مدت ۹۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد اینکوبه شد. قطعه RNA ۴۲۰ نوکلئوتیدی واکنش NASBA همراه با بافر لودینگ دناتورینگ RNA(Fermentas) روی ژل آگاروز ۲ درصد الکتروفورز شد.

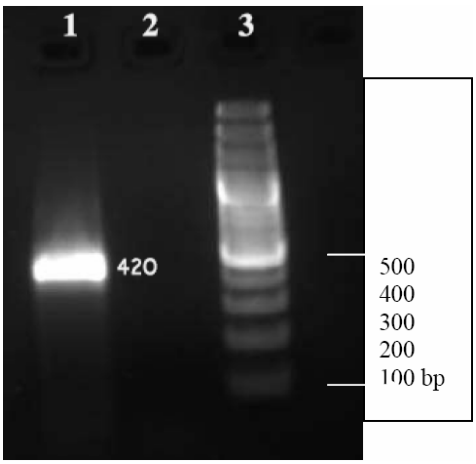
۱۳ میکرولیتر محصول واکنش RT-PCR نشاندار شده با Digoxigenin با ۲۵۰ پیکومول پروب بیوتینه (*5′-Biotin-GCATTCCGCTGACATCAATAAGG-3′*) و ۶۰ میکرولیتر بافر هیبریداسیون کیت PCR DIG Detection Roche مخلوط و به مدت یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد دناتوره و سپس تا دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خنک شد. سپس به درون چاهک‌های میکروپلیت کوت شده با استرپتاویدین اضافه و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد اینکوبه شد. پس از سه بار شستشوی چاهک‌ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی کیت و خشک کردن آنها، ۱۰ میکرولیتر آنتی‌دیگ اکسی‌ژنین کونژوگه با پراکسیداز با غلظت ۰/۰۱ میلی‌یونیت به هر چاهک اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد اینکوبه شد.پس از شستشوی مجدد چاهک‌ها با بافر شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا ATBS کیت به هر چاهک اضافه و میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر پس از ۲۰ دقیقه اندازه‌گیری شد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02]

واکنش سنتز RNA الحاقی BCR-ABL روی محصول واکنش RT-PCR بـه‌عنـوان الگـو انجـام شـد. واکـنش در حجـم ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر 5x آنزیم، ۲۰ میلی‌مول هـر یـک از NTPs، ۰/۵ میکروگـرم DNA الگـو ، ۱۲U RNasin و ۴۰U T7 RNA polymerase به مدت ۹۰ دقیقه در دمـای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شـد. پـس از حـذف DNA موجـود در واکنش به وسیله آنزیم DNase I ، بررسی کیفی و کمـی روی آن انجام شد.

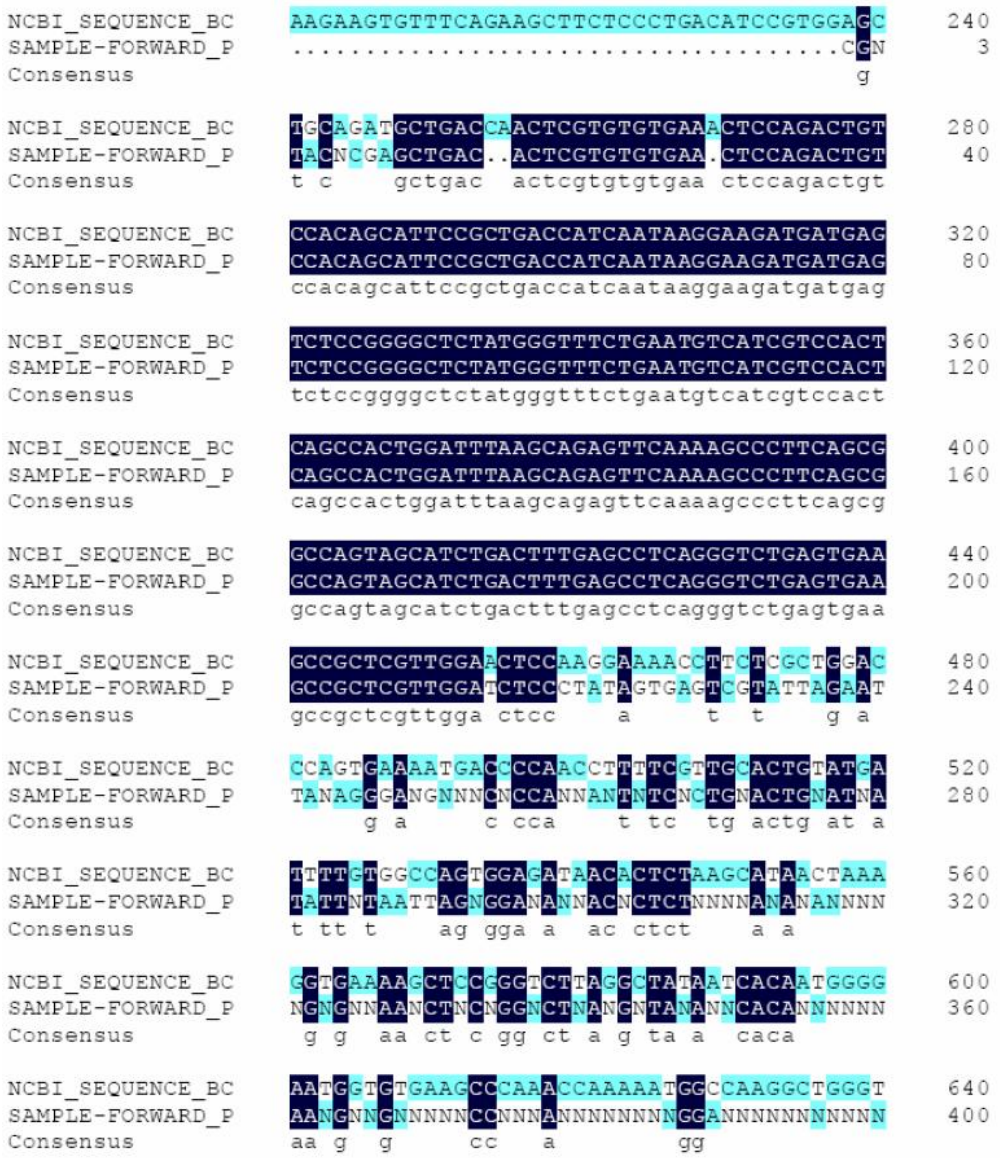
یافته‌ها

محصول تکثیرRT-PCR بـا اسـتفاده از پرایمرهـای T7pc1 و pc2 روی RNA استخراج شده از سلول‌های K562 بدست آمد (شـکل ۱). قطعه ۴۴۰ جفـت بـازی بـا اسـتفاده از پرایمـر pc2 (شـرکت TAG دانمارک) تعیین توالی شد. توالی بدست آمـده بوسـیله نـرم افزار DNAMan با توالی کامل b3a2 RNA مقایسه گردید. تـوالی یکسانی در بخشی از این دو قطعه مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۱- *لاین ۱:* محصول واکنش RT-PCR با طول ۴۲۰ جفت باز؛ *لاین ۲:* کنترل منفی؛*لاین ۳:* سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی.

شمای کلی واکـنش NASBA در شـکل ۳ نمـایش داده شـده است. تکثیر NASBA با اسـتفاده ازپرایمرهـای T7pc1 و pc2

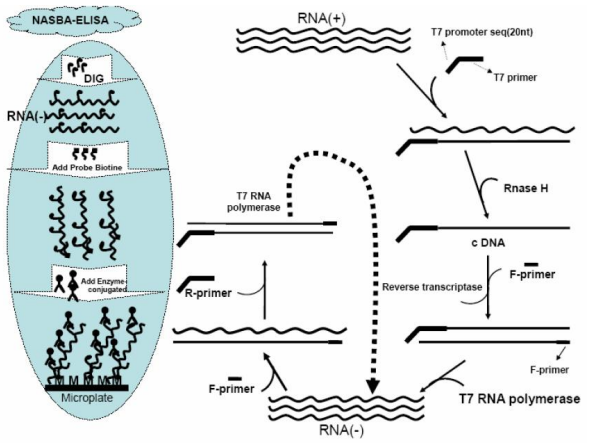


شکل ۲- مقایسه توالی محصول RT-PCR با توالی کامل mRNA رونویس bcr-abl.

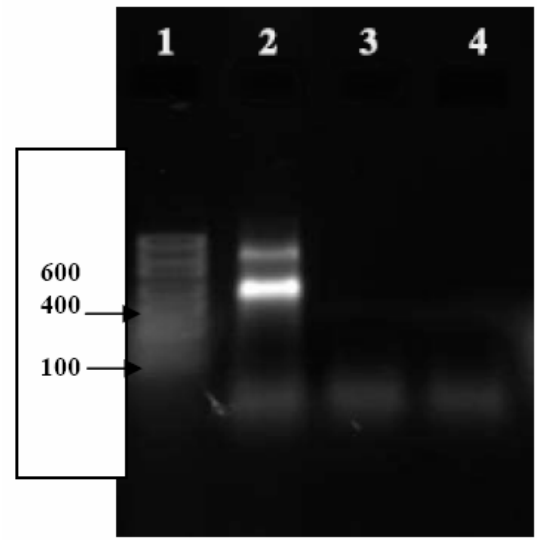
ردیف اول از بالا توالی رونویسbcr-abl ، ردیف دوم از بالا توالی سکانس شده محصولRT-PCR و ردیف سوم از بالا نوکلئوتیدی یکسان بین آنها را نشان می دهد.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02]

روی RNA استخراج شده از سلول‌های K562 و سلول‌های طبیعی به عنوان کنترل اجرا شد (شکل۴). نتیجه واکنش اکثرا یک قطعه RNA ۴۲۰ نوکلئوتیدی و یک قطعه DNA ۴۴۰ نوکلئوتیدی است که روی ژل آگاروز در شرایط دناتورینگ کمی بالاتر از نوارRNA قرار می گیرد.

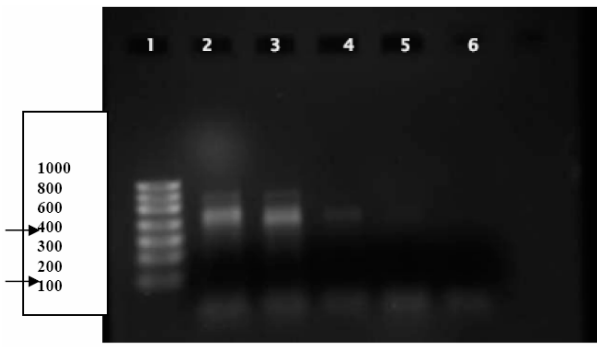


شکل ۳- شمای کلی واکنش NASBA-ELISA.



شکل ۴- *لاین ۱:* سایز مارکر RNA فرمنتاس؛ *لاین ۲:* محصول واکنش NASBA روی RNA سلول K562؛ *لاین ۳:* محصول واکنش NASBA روی RNA لنفوسیت های خون محیطی فرد طبیعی؛ *لاین ۴:* محصول واکنش NASBA روی نمونه آب (کنترل منفی).

به منظور تعیین حساسیت روش NASBA در شناسایی رونویس‌های الحاقی CML، واکنش روی یک سریال رقتی از RNA الحاقی سنتز شده در in vitro و خالص شده از ۶۰۰ پیکوگرم تا ۰/۰۶ پیکوگرم اجرا شد و نتیجه واکنش روی ژل آگاروز تحت شرایط دناتورینگ الکتروفورز شد. میزان تکثیر با کاهش غلظت RNA الگو متناسب می باشد، به طوری که در غلظت‌های ۶۰۰ پیکوگرم (معادل $۴/۲ \times ۱۰^{۸}$ نسخه RNA الگو) و ۶۰ پیکوگرم (معادل $۴/۲ \times ۱۰^{۷}$ نسخه RNA الگو) نوار تکثیری مشاهده شد. در حالی که در غلظت ۶ پیکوگرم (معادل $۴/۲ \times ۱۰^{۶}$ نسخه RNA الگو) نوار تکثیری بسیار ضعیف و در غلظت‌های کمتر از آن هیچ نواری مشاهده نشد. این نتایج در شکل ۵ نمایش داده شده است. هم چنین واکنش فوق در حضور DIG-11-UTP (به نسبت ۱/۲۰ UTP) روی سریال رقت اجرا شد. محصول واکنش هیبرید شده با پروب اختصاصی بیوتینه درون میکروپلیت‌های پوشانده شده با استرپتاویدین اینکوبه گردید. پس از شستشو و اضافه کردن آنتی دیگ کونژوگه به آنزیم پراکسیداز و سپس سوبسترای ATBS، میزان رنگ تولیدی در هر چاهک بوسیله ELISA Reader در طول موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (نمودار۱). نتایج بدست آمده با نتایج حاصله از الکتروفورز روی ژل آگاروز مطابقت داشت. با این وجود حساسیت شناسایی در روش دوم کمی بیشتر است، به طوری که کمی جذب در غلظت ۰/۶ پیکوگرم مشاهده شد.

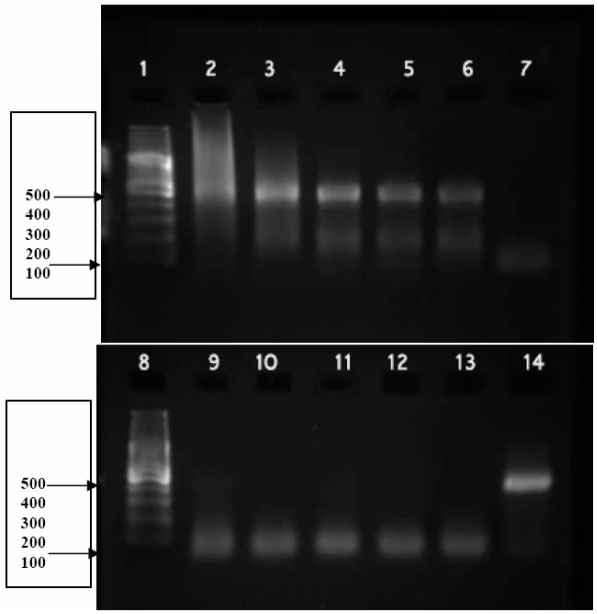


شکل ۵- *لاین ۱:* سایز مارکر RNA (فرمنتاس)؛ *لاین ۲:* واکنش NASBA روی RNA اختصاصی سنتز شده In vitro با غلظت 600 pg (4.2 × 108 RNA)؛ *لاین ۳:* روی غلظت (4.2 × 107 RNA) 60 pg؛ *لاین ۴:* روی غلظت6 pg (4.2 × 106 RNA)؛ *لاین ۵:* روی غلظت 0.6 pg (4.2 × 105 RNA)؛ *لاین ۶:* روی غلظت 0.06 pg (4.2 × 104 RNA)

هم چون مرحله قبل واکنش RT-PCR دو مرحله‌ای روی سریال رقت RNA های الحاقی CML سنتز شده in vitro از غلظت ۶۰۰ پیکوگرم تا ۰/۰۰۰۶ پیکوگرم اجرا و نتیجه روی ژل آگاروز تحت شرایط دناتورینگ الکتروفورز شد (شکل ۶). میزان تکثیر با کاهش رقت متناسب بوده، به طوری که از رقت‌های ۶۰۰ پیکوگرم (معادل $۴/۲ \times ۱۰^{۸}$ نسخه RNA الگو) تا ۰/۰۶ پیکوگرم (معادل $۴/۲ \times ۱۰^{۴}$ نسخه RNA الگو) نوار

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02]

تکثیر مشاهده گردید، اما کمتر از این رقت نواری مشاهده نشد.

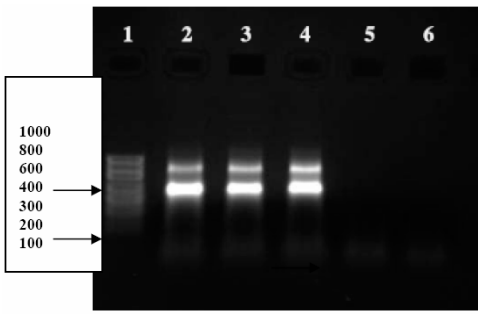


شکل ۶ –*لاین ۱:* سایز مارکر DNA (فرمنتاس)؛*لاین ۲:* واکنش RT-PCR روی غلظتpg 600(RNA 108×4.2)؛*لاین ۳:* واکنش RT-PCR روی غلظتpg 60 (RNA 107×4.2)؛*لاین ۴:* واکنش RT-PCR روی غلظت 6 pg(RNA 106×4.2)؛*لاین ۵:* واکنش RT-PCR روی غلظت 0.6 pg (RNA 105×4.2)؛*لاین ۶:* واکنش RT-PCR روی غلظت 0.06 (RNA 104×4.2)؛*لاین ۷:* واکنش RT-PCR روی ۲ سلول K562؛*لاین ۸:* سایز مارکر DNA (فرمنتاس)؛*لاین ۹:* واکنش RT-PCR روی غلظت 0.006 pg (RNA 103×4.2)؛*لاین ۱۰:* واکنش RT-PCR روی غلظت 0.0006 pg (RNA 102×4.2)؛ *لاین ۱۱:* واکنش RT-PCR روی غلظت (RNA 101×4.2) 0.00006pg؛*لاین ۱۲:* واکنش RT-PCR روی RNA استخراج شده از لنفوسیت های فرد طبیعی؛*لاین ۱۳:* واکنش RT-PCR روی H2O؛*لاین ۱۴:* واکنش RT-PCR روی ۴ سلول K562.

نتیجه واکنش فوق علاوه بر سیستم شناسایی الکتروفورز روی ژل آگاروز، از طریق ELISA نیز بررسی شد. واکنش RT-PCR در مجاورت DIG-11-dUTP (به نسبت ۱/۲۰ dTTP) اجرا شد. محصول واکنش پس از دناتوراسیون و هیبریداسیون با پروب اختصاصی بیوتینه به درون میکروپلیت‌های پوشیده شده با استرپتاویدین اینکوبه و سپس از طریق آنتی دیگ اکسی‌ژنین کونژوگه با آنزیم پراکسیداز و سوبسترا ATBS شناسایی شد. نتایج میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر در نمودار ۲ به نمایش درآمده است. در این روش حساسیت تشخیص محصول واکنش تا رقت ۰/۰۰۶ پیکوگرم (معادل $۴/۲ \times ۱۰^{۳}$ نسخه RNA الگو) افزایش یافت.

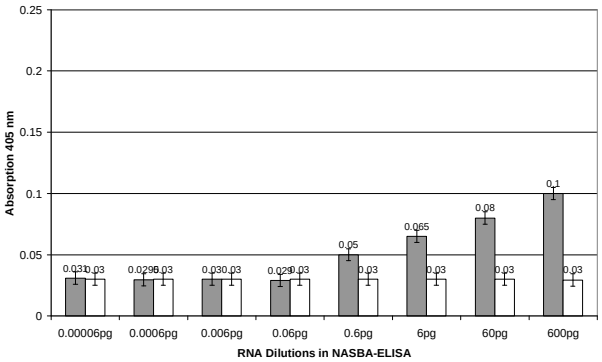
هم چنین به منظور تعیین حساسیت این دو روش روی تعداد سلول‌های K562، پس از تعیین رقت سلولی و شمارش سلول‌ها زیر میکروسکوپ، استخراج RNA از هر رقت سلولی انجام شد و سپس واکنش NASBA و RT-PCR بطور مجزا روی هر رقت اجرا شد. به دلیل حساسیت بیشتر روش ELISA نسبت به الکتروفورز روی ژل آگاروز، محصولات این دو واکنش به ترتیب با DIG-11-UTP و DIG-11-dUTP با نسبت برابر(۱/۲۰) نشاندار شد. سپس با پروب اختصاصی بیوتینه یکسان هیبرید و از طریق میکرپلیت‌های پوشانده شده با استرپتاویدین شناسایی شد. نتایج این دو واکنش در نمودار های ۳ و۴ به نمایش در آمده است. این نتایج نشان می دهد که برای شناسایی رونویس های الحاقی CML از طریق روش NASBA و RT-PCR به RNA استخراج شده به ترتیب از ۴۰۰ و ۴ سلول نیاز است.

نمونه خون سه بیمار مبتلا به CML که از طریق پارامترهای هماتولوژیکی در آزمایشگاه‌های محلی در شهرستان‌های رشت و تنکابن شناسایی شده بود، به همراه نمونه‌های خون افراد طبیعی با بافر فسفات رقیق و بوسیله محلول فایکول لنفوسیت‌های آنها جدا شد. پس از استخراج RNA توتال از آنها رسوبRNA در ۱۰ میکرولیتر آب مقطر عاری از RNase حل و در واکنش NASBA مورد استفاده قرار گرفت. سپس محصولات واکنش روی ژل آگاروز تحت شرایط دناتورینگ الکتروفورز شد. نتایج واکنش‌های فوق در شکل ۷ به نمایش در آمده است.

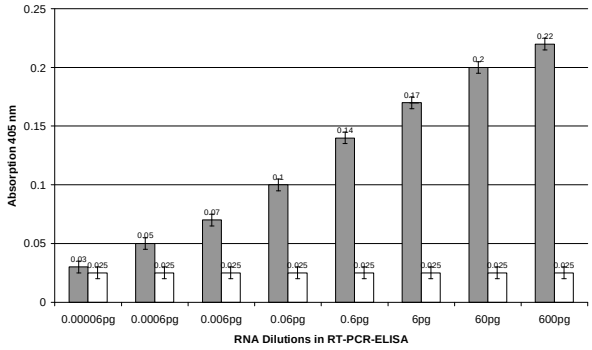


شکل ۷–*لاین ۱:* سایز مارکرRNA فرمنتاس؛*لاین ۲:* محصول واکنش NASBA روی نمونه بیمار؛*لاین ۳:* محصول واکنش NASBA روی نمونه بیمار؛*لاین ۴:* محصول واکنش NASBA روی نمونه بیمار؛*لاین ۵:* واکنش NASBA روی نمونه فرد سالم؛*لاین ۶:* کنترل منفی.

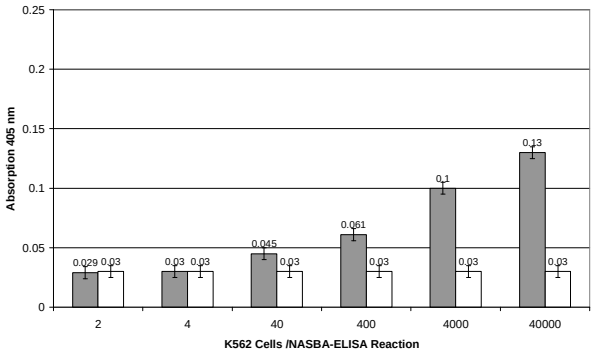
[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02]



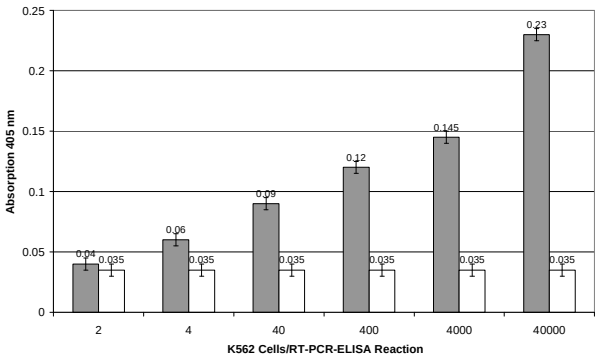
نمودار ۱- واکنش NASBA-ELISA روی سریال رقتی از RNA سنتز شده In Vitro .



نمودار۲- واکنش RT-PCR-ELISA روی سریال رقت RNA سنتز شده.



نمودار ۳- واکنش NASBA-ELISA روی رقت های مختلفی از سلول K562.



نمودار ۴- واکنش RT-PCR-ELISA روی رقت های مختلف از سلول K562.

بحث

در حال حاضر مهم‌ترین روش‌های تکثیری بر پایه RNA برای آنالیز مولکولی جابجایی‌های کروموزومی همراه با تومورهای هماتوپویتیک را می‌توان به دو دسته شامل روش غیرمستقیم و ترمال RT-PCR و روش مستقیم و ایزوترمال NASBA دسته‌بندی نمود.

هر دو تکنیک RT-PCR و NASBA دارای مزیت‌ها و معایبی می‌باشند. از نظر تئوری تفاوتی بین اختصاصیت و حساسیت این دو روش وجود ندارد. هر چند حساسیت این روش‌ها به پارامترهای مختلفی بستگی دارد که از آن جمله می‌توان به روش استخراج RNA و شرایط تکثیر هر یک اشاره نمود. اما در عمل حساسیت روش NASBA از RT-PCR کمتر است. یکی دیگر از ویژگی‌های روش RT-PCR عدم استفاده از آنزیم T7 RNA polymerase و پرایمرهای طویل‌تر در مقایسه با روش NASBA می‌باشد. همین طور از ویژگی‌های روش NASBA می توان به فقدان آلودگی ثانویه در آن به دلیل پایداری اندک RNA در محیط، عدم نیاز به دستگاه ترمال سیکلر و زمان کوتاه‌تر آن اشاره نمود.

به هرحال زمانی که هدف از توسعه یک تکنیک مولکولی گسترش آن در آزمایشگاه‌های ژنتیک است، علاوه بر اختصاصیت و حساسیت به هزینه و تجهیزات لازم برای اجرا و هم چنین مدت زمان اجرای آن نیز باید توجه نمود.

در گزارش Sooknanan و همکارانش بر پایه روش Nested-NASBA برای تکثیر رونویس‌های الحاقی CML حداکثر حساسیت گزارش شده توسط آنها، 5ng RNA است که تقریبا معادل RNA استخراج شده از ۱۰۰۰ سلول لوسمیک می باشد (۱۲).

در این تحقیق برای شناسایی محصول تکثیری از سیستم بیوتین- استرپتاویدین برای تثبیت محصول در درون میکروپلیت و از سیستم DIG-Anti-DIG conjugated (Roche) برای شناسایی محصولات تثبیت شده استفاده نمودیم. پروب بیوتینه اختصاصی برای رونویس الحاقی به گونه‌ای طراحی گردید که در هر دو سیستم قابل استفاده باشد تا مقایسه صحیح‌تری را برای ما فراهم نماید.

هر چند در این تحقیق اختصاصیت این دو روش با یکدیگر برابر می‌باشد، اما میزان حساسیت روش RT-PCR-ELISA

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02]

حداقل ۱۰۰ برابر بیشتر از روش NASBA-ELISA بوده است که این حساسیت تنها نشان دهنده عملکرد این دو روش نمی‌باشد. زیرا مرحله قبل از آن یعنی استخراج RNA بعنوان مرحله‌ای تاثیرگذار بر حساسیت مطرح است. در این مطالعه، ما از کیت استخراج RNA شرکت سیناژن با نام تجارتی RNX Solution استفاده نمودیم که یک روش استخراج Low copy number بوده و تاثیری بر حساسیت روش‌های فوق ندارد.

از اجرای واکنش RT-PCR-ELISA و NASBA-ELISA روی سریال رقت RNA سنتز شده در In vitro میتوان یک منحنی استاندارد رسم نمود که با مقایسه میزان جذب نمونه در هر دو روش با منحنی استاندارد، تعداد کپی رونویس‌های الحاقی را بطور نسبی تعیین می‌نماید.

در این تحقیق همچنین واکنش NASBA-ELISA روی RNA استخراج شده از لنفوسیت‌های جدا شده از یک میلی‌لیتر خون محیطی سه بیمار مبتلا به CML در مرحله اولیه برای تایید عملکرد تکنیک انجام گرفت. میزان جذب بدست آمده در آنها و مقایسه نسبی آن با منحنی استاندارد نمونه‌های کنترل، تعداد سلول‌های تقریبا ۵۰۰۰۰ -۴۰۰۰۰ را در هر یک از آنها نشان داد.

REFERENCES

1. Inukai T, Sugita K, SuzukiT. A novel 203 kD aberrant bcr-abl product in a girl with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. Br J Haematol 1993;85:823-25.
2. Sawyers CL, Timson L, Kawasaki ES. Molecular relapse in chronic myelogenous leukemia patients after bone marrow transplantation detected by polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:563-67.
3. Bagg A. Chronic myeloid leukemia: A minimalistic view of post-therapeutic monitoring. J Mol Diag 2002;1:1-9.
4. Chasseriau J, Rivet J, Bilan F, Chomel JC, Guilhot F, Bourmeyster N, et al. Characterization of the different BCR-ABL transcripts with a single Multiplex RT-PCR. J Mol Diag 2004;6:343-47.
5. Gutierrez M, Timson G, Siraj AK, Barbhaya S, Banavali S, Bhatia K. Single monochrome real-time RT-PCR assay for identification, quantification and breakpoint cluster region determination of t(9;22) transcripts. J Mol Diag 2005;7:40-47.
6. Zhang JG, Goldman JM, Cross NCP. Characterization of genomic BCR-ABL breakpoints in chronic myeloid leukemia by PCR. Br J Haematol 1995;90:138-46.
7. Amabile M, Giannini B, Testoni N, Montefusco V, Rosti G, Zardini C, et al. Real-time quantification of different types of bcr-abl transcript in chronic myeloid leukemia. Haematologica 2001;86:252-59.
8. Campanini F, Santucci MA, Pattacini L, Brusa G, Piccioli M, Barbieri E, et al. Competitive polymerase chain reaction as a method to detect the amplification of bcr-abl gene of chronic myeloid leukemia. Haematologica 2001;86:167-73.
9. Martin S, Lennon S, Bonham A, Cotter T. Induction of apoptosis in human leukemic cells by inhibitions of RNA or protein synthesis. J Immunol 1990;145:1859-67.
10. Compton J. Nucleic acid sequence based amplification. Nature 1991;350:91-92.
11. Hayashi T, Kobayashi H, Miyachi H, Ohshima T, Ujiiye T, Kawase M, et al. A competitive nucleic acid sequence-based amplification assay for the quantification of human MDR1 transcript in leukemia cells. Clinica Chimica Acta 2004;342:115-26.
12. Sooknanan R, Malek L, Wang XH, Keating A. Detection and direct sequence identification of BCR-ABL mRNA in ph+ chronic myeloid leukemia. Exp Hematol 1993;21:1719-24.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-02]