

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

علی ناظمی<sup>۱</sup>، مجید صادقی زاده<sup>۲</sup>، مهدی فروزنده مقدم<sup>۳</sup>، غلامرضا جوادی<sup>۴</sup>، مهرداد هاشمی<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکترای ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

<sup>۳</sup> دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

<sup>۴</sup> دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

<sup>۵</sup> استادیار گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

---

### چکیده

**سابقه و هدف:** بیماران مبتلا به لوسمی میلوبئیدی مزمم (CML) دارای کروموزوم فیلادلفیا هستند. این کروموزوم حاصل جابجایی بازوهاي بلند کروموزومهاي ۹ و ۲۲ (q34;q11) بوده که منجر به ایجاد الحاق بين ژنهای BCR و ABL می‌گردد. در اين مطالعه، تکنيک‌های NASBA و RT-PCR 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 *NASBA* و *RT-PCR* با نسبت برابری به ترتیب با *DIG-11-dUTP* و *DIG-11-dUTP* نشاندار شد. بدنبال دناتوراسیون، واکنش هیبریداسیون با پروب اختصاصی روی هر دو محصول انجام شد. محصولات در میکروپلیت‌های پوشیده شده با استریپتاویدین انکوبه شد. پس از شستشو پلیت‌ها، آنتی‌دیگ کوثرنگ به با پراکسیداز اضافه و با استفاده از سویسترا 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* توائنس ۱۰۰ پیکوگرم RNA کمتری را نسبت به *NASBA-ELISA* (۰/۰۶ در مقابل ۰/۰۶ پیکوگرم RNA) را شناسایی نماید. همچنان 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:** *NASBA-ELISA*, *RT-PCR-ELISA*, *bcr-abl*, رونویس‌های

---

### مقدمه

می‌باشد که منجر به افزایش رده‌های سلولی میلوبئید، اریتروئید و مگاکاربیوسیت در خون محیطی و هیپرپلازی میلوبئید 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) است که سبب الحاق ناحیه<sup>۱</sup> ۳

لوسمی میلوبئید مزمم (CML) یک بدھیمی کلونال (Hematopoietic stem cells) سلول‌های بنیادی هماتوپیتیک (Hematopoietic stem cells)

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: ۱۳۸۷/۴/۱۸

می‌گردد. در مرحله اول، پرایمراول (که حدوداً ۴۵ باز طول دارد که ۲۰ باز انتهای ۳ آن با انتهای ۵ توالی هدف مکمل می‌باشد و مابقی آن توالی مربوط به پرومотор فاز T7 می‌باشد) با توالی RNA هدف متصل می‌گردد. آنزیم ترانسکرپتاز معکوس با استفاده از dNTPs انتهای ۳ پرایمراول را تکثیر کرده و منجر به تولید cDNA می‌گردد. سپس RNase H در هیبرید RNA-DNA مولکول RNA را هیدرولیز می‌نماید. پرایم دوم (حدوداً ۲۰ باز طول دارد و مکمل انتهای ۵ توالی هدف می‌باشد) به cDNA تکرشتهای متصل می‌گردد. آنزیم ترانسکرپتاز معکوس رشته دوم DNA از جمله توالی فاز 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 مولکول 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 (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 مولکول Digoxigenin نشاندار می‌گردد که آنها را می‌توان پس از هیبریداسیون با پروب بیوتینه مکمل به توالی هدف از طریق میکروپلیت‌های پوشیده شده با استریتواویدین و آنتی‌بادی Anti-DIG کونژوگه شده 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، در حالی 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)

پروتوانکوژن c-abl (9q34) با ناحیه ۵ 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 (۱):

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

بیش از ۹۵ درصد از بیماران CML دارای ناحیه شکستگی در ABL M-BCR می‌باشند. در مقابل مقر شکستگی در ژن (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 (۹;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 نمائش کرموزومی اضافی که در بررسی وضعیت پیشرفت بیماری از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد، 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 می‌گردد. به هر حال در ۵ درصد موارد CML وقوع (۹;22) از طریق آنالیز سیتوژنتیکی قابل مشاهده نبوده و منجر به تفسیر کاریوتایپینگ منفی کاذب می‌گردد (۳-۶).

روش‌های مولکولی مورد استفاده برای تشخیص این اختلال عبارتند از: ساترن بلاستینگ، RT-PCR، FISH و PCR، پالس فیلد ژل الکتروفورزیس (PFGE)، و سترن Nucleic acid (NASBA) sequence based amplification بلاستینگ (Western Blotting) (۷-۹). یک روش متغیر و جدید NASBA برای تکثیر و تشخیص رونویس های PCR می‌باشد. در این تکنیک ایزوترمال (بدون نیاز به PCR) مستقیماً در یک واکنش سه آنزیمی RNA (Thermal cycler) شامل تکثیر و تحریک رونویس های avian myeloblastosis virus reverse transcriptase و T7 RNA polymerase و RNase H

۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در پایان ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه.

T7pc1: ۵'-*AATTAATACTGACTCACTATAGGGAGATG*  
*GTTTGGGCTTCACACCATTCC-3'*  
 PC2: ۵'-*GTTTCAGAAGCTTCTCCCTG-3'*

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

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

۱۳ میکرولیتر محصول واکنش RT-PCR نشاندار شده با Digoxigenin ۵'-Biotin-(GCATTCCGCTGACATCAATAAGG-3' و ۶۰ میکرولیتر بافر هیبریداسیون کیت PCR DIG Detection Roche مخلوط و به مدت یک دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد دناتوره و سپس تا دمای ۳۷ درجه سانتی گراد خنک شد. سپس به درون چاهک های میکروپلیت کوت شده با استرپتواویدین اضافه و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد اینکوبه شد. پس از سه بار شستشوی چاهک ها با ۲۵۰ میکرولیتر بافر شستشوی کیت و خشک کردن آنها، ۱۰ میکرولیتر آنتی دیگ اکسی زنین کونژوگه با پراکسیداز با غلظت ۱/۰۱ میلی یونیت به هر چاهک اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد اینکوبه شد. پس از شستشوی مجدد چاهک ها با بافر شستشوی ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا ATBS کیت به هر چاهک اضافه و میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر پس از ۲۰ دقیقه اندازه گیری شد.

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

## مواد و روشها

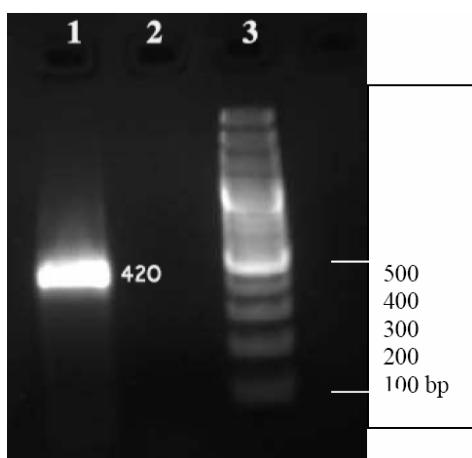
خون کامل حاوی ماده ضد انعقاد EDTA از سه بیمار مبتلا به CML شناسایی شده بر اساس ویژگی های هماتولوژیکی که به دو آزمایشگاه محلی در شهرستان رشت و تنکابن مراجعه کرده بودند، با رعایت مسائل اخلاقی و پزشکی تهیه گردید. سلول های خونی تک هسته ای پس از رقیق سازی خون با بافر فسفات به نسبت ۲:۱ و قرار گیری روی بالشتکی از محلول فایکول و سانتریفیوژ 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 میلی لیتر از بخش بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری گردید.

تو قال از ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون تغليظ شده سلولی بوسیله محلول استخراج RNA سیناژن (RNase) طبق دستور العمل 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 مرحله ای روی یک میکرولیتر (۱/۱) میکروگرم در میلی لیتر) استخراجی انجام شد. واکنش مرحله اول در حجم ۱۰ میکرولیتر حاوی ۰/۱ میکروگرم RNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم، ۵ میلی مول dNTP، ۱۲ واحد RNasin، ۱۰ پیکومول pрайمر T7pc1 M-Mulv Reverse ۱۰ درصد و ۱۰۰ واحد Transcriptase در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد 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 آنزیم، ۵ میلی مول MgCl<sub>2</sub>، ۵ میلی مول dATP، ۵ میلی مول dGTP، ۵ میلی مول dCTP، ۴/۵۷ میلی مول dTTP، ۱۰ پیکومول جفت پرایمرهای DIG/dUTP، ۰/۲۵ میلی مول Taq DNA polymerase طبق T7pc1 و pc2 و ۱/۵ واحد برنامه زیر انجام گرفت: ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۴۰ دور شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ثانیه، سپس ۴۰ دقیقه اندازه گیری شد.

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 باز.

شمای کلی واکنش NASBA در شکل ۳ نمایش داده شده است. تکثیر NASBA با استفاده از پرایمرهای pc2 و T7pc1

واکنش سنتز RNA الحاقی BCR-ABL روی محصول واکنش RT-PCR به عنوان الگو انجام شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر بافر ۵x آنزیم، ۲۰ میلیمول هر یک از ۰.۵ میکروگرم DNA الگو، RNasin ۱۲U و NTPs ۰.۵ میکروگرم T7 RNA polymerase ۴۰ U به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷°C درجه سانتی گراد انجام شد. پس از حذف DNA موجود در واکنش به وسیله آنزیم I، بررسی کیفی و کمی روی آن انجام شد.

## یافته‌ها

محصول تکثیر RT-PCR با استفاده از پرایمرهای pc2 و T7pc1 روی RNA استخراج شده از سلول‌های K562 بدست آمد (شکل ۱). قطعه ۴۴۰ جفت بازی با استفاده از پرایمر pc2 (شرکت TAG دانمارک) تعیین توالی شد. توالی بدست آمده بوسیله نرم افزار DNAMan با توالی کامل b3a2 RNA مقایسه گردید. توالی

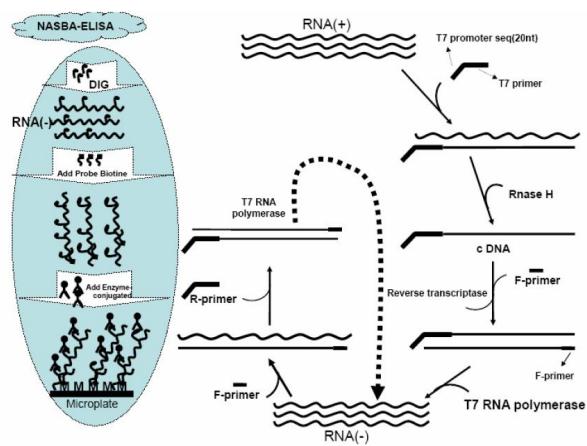
NCBI_SEQUENCE_BC SAMPLE-FORWARD_P Consensus	AAGAAGTGTTCAGAACGTTCTCCCTGACATCCGTGGAGC ..... .....	240
NCBI_SEQUENCE_BC SAMPLE-FORWARD_P Consensus	TGCAGATGCTGACCAACTCGTGTGTAAACTCCAGACTGT TACNCGAGCTGACCAACTCGTGTGTAACTCCAGACTGT t c gctgac actcgtgtgtaa ctccagactgt	280
NCBI_SEQUENCE_BC SAMPLE-FORWARD_P Consensus	CCACAGCATTCCGCTGACCATAAGGAAGATGATGAG CCACAGCATTCCGCTGACCATAAGGAAGATGATGAG ccacagcattccgctgaccataataaggaaatgttag	320
NCBI_SEQUENCE_BC SAMPLE-FORWARD_P Consensus	TCTCCGGGGCTCTATGGGTTCTGAATGTCATCGTCCACT TCTCCGGGGCTCTATGGGTTCTGAATGTCATCGTCCACT tctccggggctctatgggttctgaatgtcatcgtcact	360
NCBI_SEQUENCE_BC SAMPLE-FORWARD_P Consensus	CAGCCACTGGATTAAAGCAGAGTTCAAAAGCCCTTCAGCG CAGCCACTGGATTAAAGCAGAGTTCAAAAGCCCTTCAGCG cagccactggatttaagcagagttcaaaaggcccttcagcg	400
NCBI_SEQUENCE_BC SAMPLE-FORWARD_P Consensus	GCCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCAGGGTCTGAGTGAA GCCAGTAGCATCTGACTTTGAGCCTCAGGGTCTGAGTGAA gccagtagcatctgactttgagcctcagggtctgagtgaa	440
NCBI_SEQUENCE_BC SAMPLE-FORWARD_P Consensus	GCCGCTCGTTGGAACTCCAAGGAAAACCTTCTCGCTGGAC GCCGCTCGTTGGAACTCCAATAGTGAGTCGTATTAGAAT gccgctcggttga ctcc a t t g a	480
NCBI_SEQUENCE_BC SAMPLE-FORWARD_P Consensus	CCAGTCAAATGACCCCCAACCTTTTCGTTGCACTGTATGA TANAGGGANGNNNNCCANNANTNTCNCTGNACTGNATNA g a c c a t t c t g a t a	520
NCBI_SEQUENCE_BC SAMPLE-FORWARD_P Consensus	TTTGTGGCCAGTGGAGATAACACTCTAACGATAACTAAA TATTNTAATTAGNNGGANANNACNCTTNNNNNANANNNNN t tt t ag gga a ac ctct a a	560
NCBI_SEQUENCE_BC SAMPLE-FORWARD_P Consensus	GGTGAAAAGCTCCGGGTCTTAGGCTATAATCACAATGGGG NGNGNNAANCTNCNGGNCTNANGNTANANNCACANNNNNN g g aa ct c gg ct a g ta a caca	600
NCBI_SEQUENCE_BC SAMPLE-FORWARD_P Consensus	AATGGTGTGAAGCCAAACCAAAATGGCCAAGGCTGGGT AANGNNNNNNNNCCNNNNNNNNNGGANNNNNNNNNNNN aa g g cc a gg	640

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

ردیف اول از بالا توالی رونویس bcr-abl، ردیف دوم از بالا توالی سکانس شده محصول RT-PCR و ردیف سوم از بالا نوکلوتیدی یکسان بین آنها را نشان می‌دهد.

کاهش غلظت RNA الگو متناسب می باشد، به طوری که در غلظت‌های  $600 \text{ p}\mu\text{g}$  (معادل  $4.2 \times 10^8 \text{ RNA}$  نسخه الگو) و  $60 \text{ p}\mu\text{g}$  (معادل  $4.2 \times 10^7 \text{ RNA}$  نسخه الگو) نوار تکثیری مشاهده شد. در حالی که در غلظت  $6 \text{ p}\mu\text{g}$  (معادل  $4.2 \times 10^6 \text{ RNA}$  نسخه الگو) نوار تکثیری بسیار ضعیف و در غلظت‌های کمتر از آن هیچ نواری مشاهده نشد. این نتایج در شکل ۵ نمایش داده است. هم چنین واکنش فوق در حضور DIG-11-UTP (به نسبت UTP ۱/۲۰) روی سریال رقت اجرا شد. محصول واکنش هیبرید شده با پروب اختصاصی بیوتینه درون میکروپلیت‌های پوشانده شده با استرپتواویدین اینکوبه گردید. پس از شستشو و اضافه کردن آنتی دیگ کونژوگه به آنزیم پراکسیداز و سپس سوبسترای ELISA، میزان رنگ تولیدی در هر چاهک بوسیله ATBS Reader در طول موج  $405 \text{ nm}$  اندازه‌گیری شد (نمودار ۱). 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  $0.6 \text{ p}\mu\text{g}$  مشاهده شد.

روی RNA استخراج شده از سلول‌های K562 و سلول‌های طبیعی به عنوان کنترل اجرا شد (شکل ۴). نتیجه واکنش اکثرا یک قطعه RNA  $420 \text{ nt}$  نوکلئوتیدی و یک قطعه DNA  $440 \text{ nt}$  نوکلئوتیدی است که روی ژل آگاروز در شرایط دناتورینگ کمی بالاتر از نوار RNA قرار می گیرد.

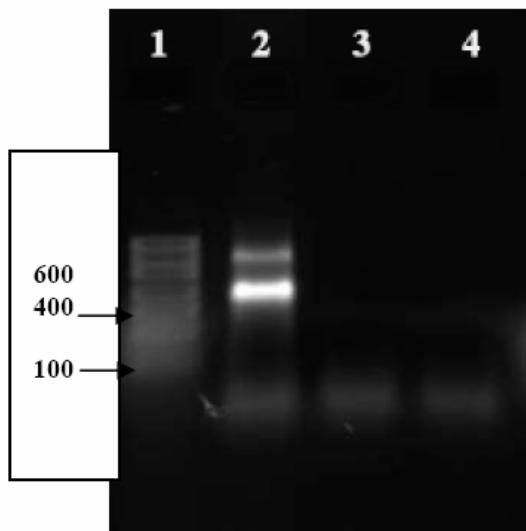


شکل ۳- شماتی کلی واکنش .NASBA-ELISA



شکل ۵- لاین ۱: سایز مارکر RNA (فرمنتاس)، لاین ۲: واکنش روی RNA اختصاصی سنتز شده In vitro NASBA (4.2  $\times 10^8$  RNA)، لاین ۳: روی غلظت (4.2  $\times 10^7$  RNA) 600 pg، لاین ۴: روی غلظت 60 pg، لاین ۵: روی غلظت (4.2  $\times 10^6$  RNA) 0.6 pg، لاین ۶: روی غلظت (4.2  $\times 10^5$  RNA) 0.06 pg

هم چون مرحله قبل واکنش RT-PCR دو مرحله‌ای روی سریال رقت RNA های الحاقی CML سنتز شده in vitro از غلظت  $600 \text{ p}\mu\text{g}$  تا  $0.06 \text{ p}\mu\text{g}$  (معادل  $4.2 \times 10^8$  RNA نسخه الگو) ژل آگاروز تحت شرایط دناتورینگ الکتروفورز شد (شکل ۶). میزان تکثیر با کاهش رقت متناسب بوده، به طوری که از رقت‌های  $600 \text{ p}\mu\text{g}$  (معادل  $4.2 \times 10^8 \text{ RNA}$  نسخه الگو) تا  $0.06 \text{ p}\mu\text{g}$  (معادل  $4.2 \times 10^4 \text{ RNA}$  نسخه الگو) نوار



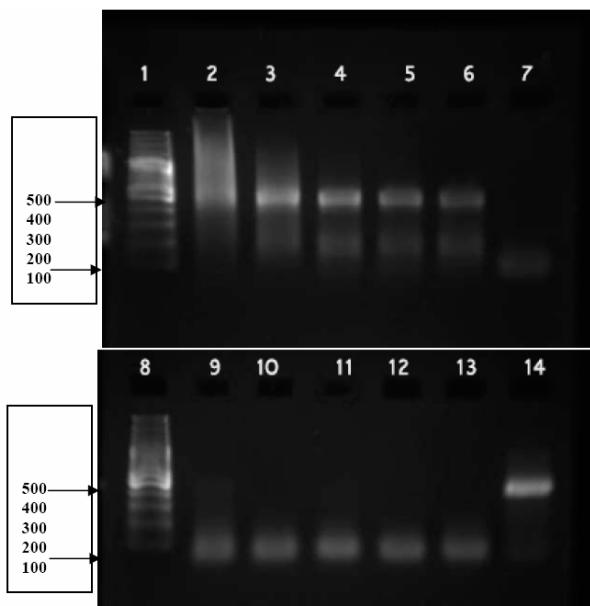
شکل ۴- لاین ۱: سایز مارکر RNA فرمنتاس، لاین ۲: محصول واکنش NASBA روی RNA سلول K562، لاین ۳: محصول واکنش RNA روی لنفوцит‌های خون محیطی فرد طبیعی، لاین ۴: محصول واکنش NASBA روی نمونه آب (کنترل منفی).

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  $600 \text{ p}\mu\text{g}$  تا  $0.06 \text{ p}\mu\text{g}$  (معادل  $4.2 \times 10^8$  RNA نسخه الگو) ژل آگاروز تحت شرایط دناتورینگ الکتروفورز شد. میزان تکثیر با

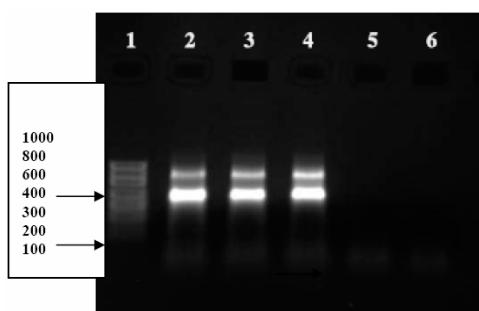
هم چنین به منظور تعیین حساسیت این دو روش روی تعداد سلول‌های K562، پس از تعیین رقت سلولی و شمارش سلول‌ها زیر میکروسکوپ، استخراج RNA از هر رقت سلولی انجام شد و سپس واکنش RT-PCR و NASBA بطور مجزا روی هر رقت اجرا شد. به دلیل حساسیت بیشتر روش ELISA نسبت به الکتروفورز روی ژل آگاروز، محصولات این دو واکنش به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

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

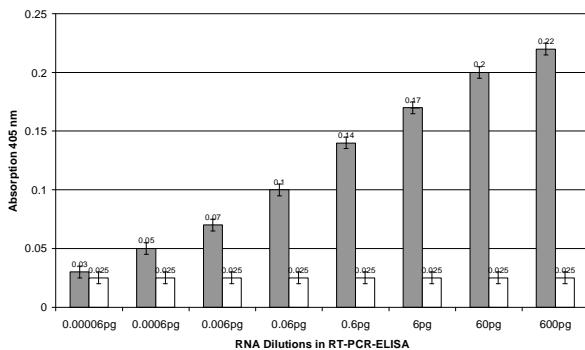


شکل ۶ - لاین ۱: سایز مارکر DNA (فرمنتاس)، لاین ۲: واکنش RT-PCR روی غلظت RNA $600\text{ pg}$ ؛ لاین ۳: واکنش RT-PCR روی غلظت RNA $60\text{ pg}$ ؛ لاین ۴: واکنش RT-PCR روی غلظت RNA $6\text{ pg}$ ؛ لاین ۵: واکنش RT-PCR روی غلظت RNA $0.6\text{ pg}$ ؛ لاین ۶: واکنش RT-PCR روی غلظت RNA $0.06\text{ pg}$ ؛ لاین ۷: واکنش RT-PCR روی RNA $0.006\text{ pg}$ ؛ لاین ۸: سلول K562؛ لاین ۹: سایز مارکر DNA (فرمنتاس)، لاین ۱۰: واکنش RT-PCR روی غلظت RNA $0.0006\text{ pg}$ ؛ لاین ۱۱: واکنش RT-PCR روی غلظت RNA $0.00006\text{ pg}$ ؛ لاین ۱۲: واکنش RT-PCR روی RNA استخراج شده از لنفوسیت‌های فرد طبیعی؛ لاین ۱۳: واکنش RT-PCR روی H2O؛ لاین ۱۴: واکنش RT-PCR روی ۴ سلول K562.

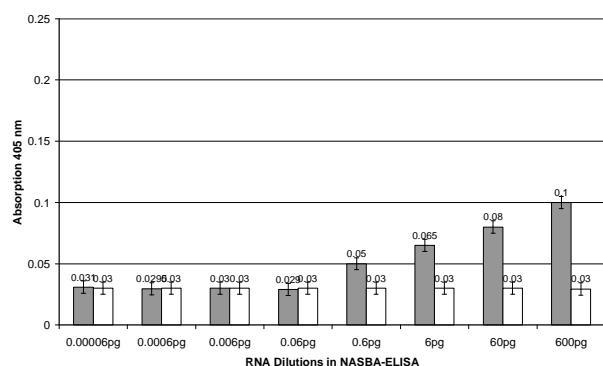


شکل ۷ - لاین ۱: سایز مارکر RNA فرمنتاس؛ لاین ۲: محصول واکنش NASBA روی نمونه بیمار؛ لاین ۳: محصول واکنش NASBA روی نمونه بیمار؛ لاین ۴: محصول واکنش NASBA روی نمونه فرد سالم؛ لاین ۵: واکنش NASBA روی نمونه فرد سالم؛ لاین ۶: کنترل منفی.

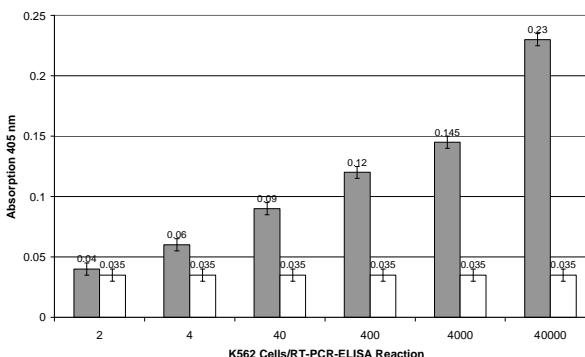
نتیجه واکنش فوق علاوه بر سیستم شناسایی الکتروفورز روی ژل آگاروز، از طریق ELISA نیز بررسی شد. واکنش RT-PCR در مجاورت DIG-11-dUTP (به نسبت DIG-11-UTP ۱/۲۰) اجرا شد. محصول واکنش پس از دناتوراسیون و هیبریداسیون با پروب اختصاصی بیوتینه به درون میکرپلیت‌های پوشیده شده با استرپتووایدین اینکوبه و سپس از طریق آنتی دیگ اکسیژنی 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  $10^{-3} \times 4/2$  نسخه RNA الگو) افزایش یافت.



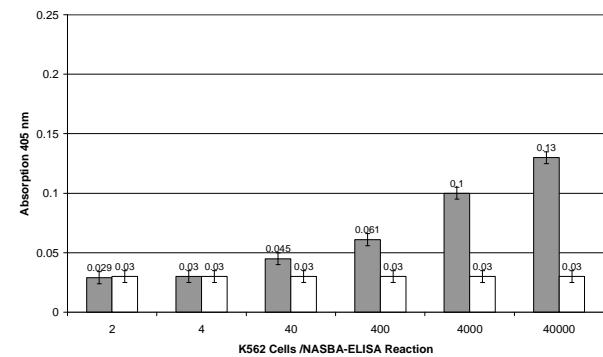
نمودار ۲- واکنش RT-PCR-ELISA روی سریال رقت RNA سنتز شده.



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



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



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

به هر حال زمانی که هدف از توسعه یک تکنیک مولکولی گسترش آن در آزمایشگاه های 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-PCR برای تکثیر رونویس های الحاقی CML حداکثر حساسیت گزارش شده توسط آنها، 5ng RNA است که تقریباً معادل RNA استخراج شده از ۱۰۰۰ سلول لوسمیک می باشد (۱۲).

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

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

## بحث

در حال حاضر مهم ترین روش های تکثیری بر پایه RNA برای آنالیز مولکولی جابجایی های کروموزومی همراه با تومور های هماتوپویتیک را می توان به دو دسته شامل روش غیر مستقیم و ترمال RT-PCR و روش مستقیم و ایزو ترمال دسته بندی نمود.

هر دو تکنیک RT-PCR و NASBA دارای مزیت ها و معایبی می باشند. از نظر تئوری تفاوتی بین اختصاصیت و حساسیت این دو روش وجود ندارد. هر چند حساسیت این روش ها به پارامترهای مختلفی بستگی دارد که از آن جمله می توان 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 ویژگی های روش RT-PCR عدم استفاده از آنزیم T7 RNA polymerase و پرایمرهای طویل تر در مقایسه با روش NASBA می باشد. همین طور از ویژگی های 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 کوتاه تر آن اشاره نمود.

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 لنفوцит‌های 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 تقریباً ۴۰۰۰۰ - ۵۰۰۰۰ را در هر یک از آنها نشان داد.

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 تجاری Low RNX Solution استفاده نمودیم که یک روش استخراج copy number بوده و تاثیری بر حساسیت روش‌های فوق ندارد.

از اجرای واکنش NASBA-ELISA و RT-PCR-ELISA روی سریال رقت RNA سنتز شده در *In vitro* میتوان یک

## REFERENCES

1. Inukai T, Sugita K, Suzuki T. 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, Ujiie 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.