خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۶ شماره ۳ پاییز ۹۸ (۲۰۰-۱۹۴)

مقاله پژوهشی

راه‌اندازی روش Real – Time PCR جهت تعیین بار پرووایرال ویروس لنفوتروپیک T انسانی نوع I به روش سایبرگرین جهت نمونه‌های اهداکنندگان خون

حمیده قاسم‌زادگان[۱]، مجید شهابی[۲]، نگار رضایی[۳]، زهره شریفی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

استان خراسان در ایران برای ویروس HTLV-1 اندمیک است. با توجه به ناکارآمد بودن آزمایش‌های سرولوژیکی در شناسایی ویروس‌ها در دوره کمون، تایید جواب‌های نامشخص وسترن بلات و خطر انتقال ویروس HTLV-1 از راه خون و فرآورده‌های خونی، آزمایش Real – Time PCR به روش سایبرگرین راه‌اندازی شد. نمونه‌های مورد آزمایش، مربوط به اهداکنندگان خون آلوده به این ویروس در پایگاه انتقال خون استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۶ بودند.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، با استفاده از روش کلونینگ و رسم منحنی استاندارد، آزمایش Real - Time PCR برای تعیین پرووایرال لود راه‌اندازی شد. ابتدا DNA ژنومی از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی استخراج شد. سپس محصول PCR ژن *Tax* ، در یک وکتور کلونینگ قرار داده شد و با رقت‌سازی، منحنی استاندارد رسم و آزمایشReal – Time PCR با روش سایبرگرین راه‌اندازی شد.

یافته‌ها

با استفاده از محصول PCR برای ژن *Tax* ، وکتور pTZ57/T و باکتری *E.Coli* (سوش TG1) کلونینگ انجام شد. صحت کلونینگ با Colony PCR و تعیین سکانس تایید شد. محصول کلونینگ به عنوان استاندارد آزمایش Real –Time PCR استفاده شد و با رقت‌سازی، منحنی استاندارد رسم شد. شیب خط منحنی استاندارد ۳/۳ =slope و R^2 = ۰/۹۹ بوده که نشان‌دهنده خطی بودن و کارآیی واکنش آزمایش می‌باشد.

نتیجه گیری

روش Real –Time PCR جهت تعیین پرووایرال لود ویروس HTLV-1 مناسب است.

کلمات کلیدی: **ویروس HTLV-1 ، پرووایروس، Real - Time PCR**

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۹
تاریخ پذیرش: ۹۸/ ۵/۲۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD بیوتکنولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- PhD اپیدمیولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات بیماری‌های غیرواگیر پژوهشگاه غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران ـ تهران ـ ایران
۴- مؤلف مسئول: PhD ویروس‌شناسی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

مقدمه

ویروس HTLV (Human T-cell Leukemia/Lymphoma)، یک رتروویروس متعلق به خانواده رتروویریده می‌باشد. شیوع ویروس لوسمی/لنفوم سلول‌های T انسانی(HTLV-1) در مناطق اندمیک در اهدا کنندگان خون بین ۲/۱-۰/۶ درصد و در مناطق غیر اندمیک کمتر از ۰/۱ درصد است(۱). ژنوم ویروس دو کپی از RNA تک رشته‌ای می‌باشد. این ویروس‌ها فعالیت ترانس کریپتازی معکوس دارند که از روی RNA می‌توانند DNA بسازند. HTLV-1 از طریق خون و محصولات خونی آلوده، استفاده از داروهای داخل رگی، تماس جنسی و انتقال از مادر به نوزاد از طریق شیر مادر منتقل می‌شود. احتمال سرایت ویروس HTLV از راه انتقال خون به میزان شیوع ویروس در جمعیت عمومی و اهداکنندگان، مرحله و دوره کمون بیماری، نوع محصول خونی دریافت شده و مدت زمان ذخیره‌سازی محصولات خونی بستگی دارد(۲). تقریباً ۳۰٪ افراد آلوده به این ویروس بدون علامت هستند .نوع بیماری ایجاد شده با روش انتقال ویروس در ارتباط است. انتقال خون بیشتر با ایجاد HAM/TSP(HTLV-1 Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis) مرتبط است. البته موارد ATL هم مشاهده شده است(۲). بعد از انتقال ویروس، رونویسی معکوس از RNA ژنومی آن باعث تولید DNA پرو وایرال می‌شود، پرووایروس‌ها به وسیله اینتگراز ویروسی به درون ژنوم میزبان وارد می‌شوند. سپس آلودگی HTLV-1 ، با حداقل تولید ذرات ویروسی، در سلول‌های در حال تقسیم منتشر می‌گردد. بنابراین تعیین میزان پرو ویروس بازتابی از تعداد سلول‌های آلوده می‌باشد. آزمایش‌های سرولوژیکی که برای تشخیص HTLV استفاده می‌شود قادر به تشخیص بیماری در مرحله ابتدایی آلودگی یعنی زمانی که هنوز سیستم ایمنی در مرحله شروع پاسخ است و هنوز آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه HTLV-1 در سرم فرد ظاهر نشده است(یا این که تیتر پایین است) نمی‌باشند(۲). هم چنین به علت خطر انتقال ویروس HTLV-1 از راه خون و فرآورده‌های خونی و با توجه به آلودگی اهداکنندگان خون در مناطق آندمیک با این ویروس برای دستیابی به تعداد کپی پرو ویروس و وضعیت آن در پیشرفت بیماری در اهداکنندگان، وجود یک آزمایش کمی و مولکولی برای تعیین پرووایرال لود در اهداکنندگان خون نیاز است(۲). علاوه بر این، آزمایش PCR برای تایید جواب‌های نامشخص وسترن بلات نیز کارآیی دارد(۳). این پروژه با استفاده از روش کلونینگ پلاسمید حاوی ژن *Tax* به عنوان استاندارد، آزمایش Real- Time PCR برای تعیین پرووایرال لود راه‌اندازی شد. HTLV-1 معمولاً به صورت خارج از سلول دیده نمی‌شود (۵، ۴)، بنابراین به جای RNA ویروس برای تعیین پرووایرال لود ویروس، از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که پرووایروس HTLV-1 را حمل می‌کنند استفاده می‌شود(۵). DNA ژنومی از سلول-های تک هسته‌ای خون محیطی که پرووایروس HTLV-1 را حمل می‌کنند استخراج شده و سپس بر روی DNA استخراج شده، آزمایش PCR انجام شد. با استفاده از محصول ژن *Tax* در وکتور pTZ57R/T کلونینگ این ژن انجام شد. در نهایت از پلاسمید حاوی ژن *Tax* به عنوان استاندارد آزمایش Real-Time PCR استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، ابتدا نمونه چند نفر از اهداکنندگان خون آلوده به HTLV-1 در استان خراسان رضوی در لوله‌های حاوی EDTA جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه ویروس‌شناسی منتقل گردید. در غربالگری اولیه آزمایش الایزا(کیت MP دیاگنوستیکا) بر روی سرم این بیماران انجام شد. سپس برای تایید نتیجه آن بر روی همان نمونه‌ها آزمایش وسترن بلات(کیت MP دیاگنوستیکا) انجام گردید و نتایج آزمایش الایزا با وسترن بلات تایید شد. سپس استخراج DNA از نمونه‌های بافی‌کوت اهداکنندگان خون آلوده به HTLV-1 با استفاده از کیت یکتا تجهیز آزما به شماره ساخت DNB2015042202 انجام شد و بر روی ژن *Tax* با استفاده از Master Mix (دانمارک، آمپلیکون) آغازگرها و چرخه دمایی مشخص آزمایش Nested PCR انجام شد(جداول ۱ و ۲). موارد مثبت جهت کلونینگ و تهیه استاندارد، تحت Real Time PCR جهت پرووایرال لود با استفاده از آغازگرها قرار گرفتند(جدول ۳).

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده جهت Nested PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر
آغازگر بیرونی جلوبرنده ژن *Tax*	TCGAAACAGCCCTGCAGATA
آغازگر بیرونی معکوس ژن *Tax*	TGAGCTTATGATTTGTCTTCA
آغازگر درونی جلوبرنده ژن *Tax*	ATACAAAGTTAACCATGCTT
آغازگر درونی معکوس ژن *Tax*	AGACTCAGAGCCTTAGTCT

جدول ۲: جدول زمانی و دمایی آزمایش Nested PCR

مرحله	دما	زمان	چرخه
دناتوراسیون اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۴	۶۰ ثانیه	۳۵
آنیلینگ	۵۸	۷۵ ثانیه	
گسترش	۷۲	۹۰ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

جدول ۳: توالی آغازگرهای Real Time PCR

نام آغازگر	توالی آغازگر	Amplicon Length
HTLV-1 جلوبرنده	5`-CCCACAATCCAACCAGCTCAG-3`	۱۸۵ bp
HTLV-1 معکوس	5`-GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT-3`	
GAPDH جلوبرنده	5`-ACGCATTTGGTCGTATTGGG-3`	۲۶۴ bp
GAPDH معکوس	5`-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3`	

محصولات PCR پس از انجام آزمایش، از لحاظ تکثیر ژن *TAX* بررسی شدند. برای تایید محصول PCR ، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ انجام شد.

کلونینگ و واکنش اتصال (Ligation Reaction) محصول PCR با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول PCR (آلمان، رُوش) انجام شد. سپس کلونینگ ژن *Tax-1* با استفاده از کیت کلونینگ فرمنتاز در پلاسمید pTZ57R/T صورت پذیرفت. واکنش اتصال قطعات محصول PCR با پلاسمید pTZ57R/T طبق روش کیت انجام شد. برای انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری *E.coli* مستعد سوش *TG1 (Transformation)* از روش شوک حرارتی استفاده شد. استخراج پلاسمید نوترکیب با استفاده از کیت رُوش صورت پذیرفت. با استفاده از روش PCR و آغازگر اختصاصی قطعه مورد نظر، وجود قطعه DNA خارجی در ناقل پلاسمیدی تایید شد(جدول ۳).

جهت تعیین توالی، نمونه پلاسمیدهای نوترکیب خالص شده به همراه آغازگرهای ژن *Tax* به شرکت ژن فن‌آوران ارسال گردید. جهت انجام آزمایش Real - Time PCR ، بعد از تهیه منحنی استاندارد و انجام مراحل کنترل کیفی، آزمایش Real - Time PCR به روش سایبرگرین روی DNA ژنومی استخراج شده انجام شد. از ژن *Tax* که توسط روش کلونینگ به دست آمد، به عنوان استاندارد Real - Time PCR استفاده شد. ابتدا تعداد کپی پلاسمید نوترکیب محاسبه شد سپس بر روی پلاسمید نوترکیب، رقت‌سازی($۱۰^{۹}$ copy/µL – $۱۰^{۱}$ copy/µL) انجام شد و آزمایش Real - Time PCR با استفاده از چرخه دمایی

منحنی استاندارد رسم شد(جدول ۴).

جهت ولیدیشن Real - Time PCR مراحل زیر انجام شد: حساسیت (Analytical Sensitivity) : سه رقت از استاندارد ($۱۰^{۱}$copy/µL–$۱۰^{۳}$copy/µL) در سه روز مختلف به صورت تکرار ۸ تایی آزمایش استفاده شد.

خطی بودن(Linearity): پنج رقت از استاندارد PTZ-HTLV-1 ($۱۰^{۲}$copy/µL–$۱۰^{۶}$copy/µL) به صورت پنج تایی در یک روز آزمایش شد. دقت(Precision): شش رقت از استاندارد($۱۰^{۱}$copy/µL–$۱۰^{۶}$copy/µL) به صورت شش تایی در یک روز برای اینترا اسی. کارآیی(Efficiency): آمپلیفیکاسیون می‌باشد که با فرمول $E= ۱۰^{-۱/slope}$ محاسبه می‌شود. شیب خط و $R^{۲}$ (Slope) : در واقع خطی بودن نتایج را نشان می‌دهد.

جدول ۴: جدول زمان‌بندی Real Time PCR

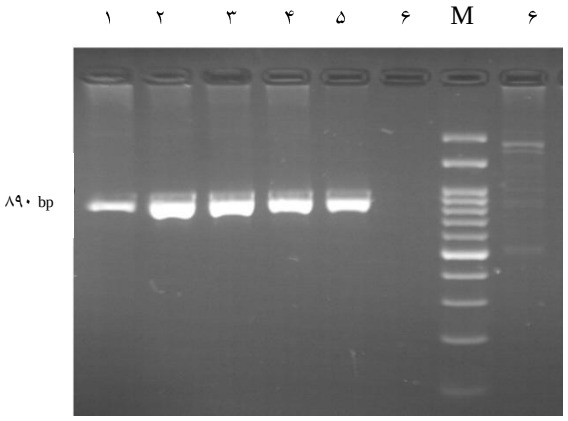
Cycle	Cycle Point	
۱	۱۵ دقیقه	۹۵ ºC
۴۵	۳۰ ثانیه	۹۵ ºC
	۳۰ ثانیه	۵۸ ºC
	۴۵ ثانیه	۷۲ ºC
آنالیز منحنی ذوب	۰/۳ ºC/ثانیه	۶۵ ºC–۹۸ ºC

یافته‌ها

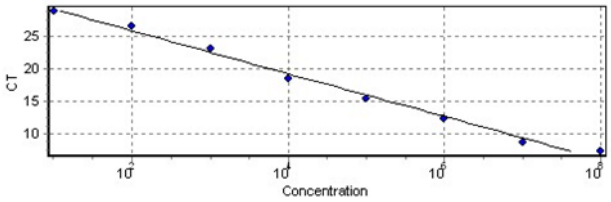
محصول آزمایش Nested PCR الکتروفورز شد. وجود باند ۸۹۰ bp نشان‌دهنده تکثیر ژن *Tax* بود(شکل ۱).

پس از مرحله کلونینگ، بر روی پلاسمید نوترکیب آزمایش PCR و الکتروفورز انجام شد. هم چنین پلاسمید نوترکیب تعیین سکانس شد و کلونینگ تایید گردید.

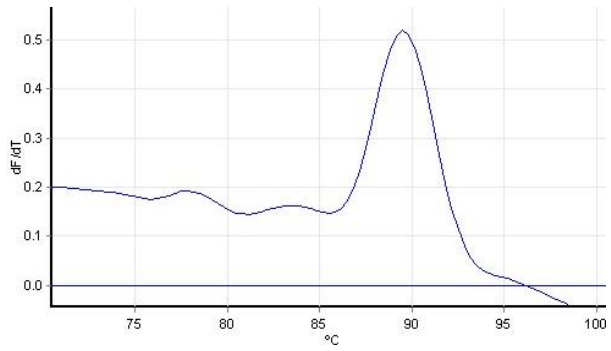
در نهایت آزمایش Real - Time PCR بر روی رقت‌های مختلف پلاسمید نوترکیب انجام شد. حساسیت (Analytical Sensitivity) در سه رقت از استاندارد ($۱۰^{۱}$copy/µL–$۱۰^{۳}$copy/µL) در سه روز مختلف به صورت تکرار ۸ تایی آزمایش انجام شد که قادر به تشخیص $۱۰^{۱}$copy/µL ذره ویروسی بود. خطی بودن و کارآیی آمپلیفیکاسیون دارای شیب خط ، برابر ۳/۳ و $R^{۲}$ آن ۰/۹۸< بود (نمودار ۱). جهت بررسی اختصاصی بودن واکنش‌ها از منحنی ذوب استفاده شد که دمای ۸۹ درجه سانتی‌گراد نشان داد واکنش آزمایش اختصاصی می‌باشد(نمودار ۲).



شکل ۱: مشاهده باند ۸۹۰ bp نشان‌دهنده حضور ژن *Tax* در نمونه‌ها در کنار مارکر ۱۰۰ bp



نمودار ۱: نمودار منحنی استاندارد Real Time PCR با استفاده از رقت‌های مختلف پلاسمید نوترکیب($۱۰^{۱}$ copy/µL – $۱۰^{۹}$ copy/µL)



نمودار ۲: نمودار منحنی استاندارد Real Time PCR با استفاده از رقت‌های مختلف پلاسمید نوترکیب ($۱۰^{۱}$copy/µL–$۱۰^{۹}$copy/µL)

بحث

در مقالات متعددی از سنجش لـود ویـروس بـه عنـوان یک فاکتور پیش‌آگهی و پایش بیماران تحت درمان نام برده شده است(۷، ۶). چون پرووایرال لود یک فـاکتور مهـم در ایجاد و پیشرفت بیماری‌های مرتبط با HTLV-1 است، نیـاز به انجام یک آزمایش کمی احساس می‌شود. آیکو ماسـاکی و همکاران در مقاله خود بیـان کردنـد کـه پرووایـرال لـود بالاتر در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطـی بـه عنـوان یک فاکتور خطر در ایجاد ATL می‌باشد.

هم چنین ارتباط مستقیم و چشـمگیری بـین پرووایـرال لود در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و میـزان بیـان PD-1 (Program Cell Death Protein) و کـاهش عملکـرد Tax-CTL وجود دارد(۸).

واترز و همکاران در مطالعه خود بیان کردند که آزمایش qPCR (Quantitative PCR) ولیـد شـده، بـه عنـوان یـک آزمایش کارآمد که قادر به اندازه‌گیری پرووایرال لود باشـد و هم چنین قابلیت تکرارپـذیری داشـته باشـد، مـورد نیـاز است. از آن جایی که هنوز یک بیومارکر اختصاصـی بـرای پیش‌بینی پیشرفت بیماری در افـراد بـدون علامـت وجـود ندارد و از طرفی میزان آنتی‌بادی اختصاصی علیه HTLV-1 بـا پرووایـرال لـود ویـروس همبسـتگی دارد، مـی‌تـوان از پرووایرال لود به عنوان روشی برای پیش‌بینی نتایج عفونت و پیشرفت بیماری استفاده نمود(۹).

بـه طـور روتـین از روش الایـزا بـرای غربـالگری اهداکنندگان خون استفاده می‌شود و به کمک وسترن بـلات نتایج آن تایید می‌گردد. آزمایش الایـزا حساسـیت بـالا دارد ولی ممکن اسـت اختصاصـیت بـالایی نداشـته باشـد و بـا آنتی‌ژن‌های دیگری واکنش متقاطع بدهد. وسترن بلات نیز یک روش سنجش ایمنی بر پایه آنتی‌بادی مـی‌باشـد کـه بـه عنوان آزمایش تاییدی در کسانی کـه از نظـر آنتـی‌بـادی بـا آزمایش الایزا مثبت بوده‌اند استفاده می‌شود. وسترن بلات و روش‌های مبتنی بر سنجش آنتی‌بادی در بیماران با سـرکوب یا ضعف سیستم ایمنی، در کسانی که در دوره پنجره هستند، در عفونت‌های اخیر و در نوزادان روش مناسبی نمـی‌باشـد. در روش وسترن بلات گاهی جواب‌ها نامشخص است که میزان این جواب‌ها از ۰/۲ در مناطق غیر اندمیک تـا ۵۰٪ در مناطق اندمیک متغیر است. ایـن جـواب‌هـای بـدون پاسـخ ممکن است نشان‌دهنـده عفونـت واقعـی HTLV-1 ، مثبـت کاذب و یا تغییرات سرمی باشد. پس برای رفع این مشـکل نیاز به آزمایش‌های مولکولی می‌باشـد. روش‌هـایی کـه بـر اسـاس ازدیـاد DNA اسـت مثـل PCR و Real Time PCR روش‌هـای مناسـبی هسـتند. مزیـت روش qPCR آلـودگی کمتر نسبت به PCR معمولی می‌باشد. هم چنین می‌توان در هر مرحله‌ای از آزمایش نتیجه را مشاهده کرد و مانند PCR معمولی نیاز نیست که کل پروسه به اتمام برسد.

از طرفی نسبت به روش‌هـای متـداول کشـت، سـرعت بـالاتر و قیمـت مناسـب‌تـر دارد. روش Real Time بـه دو شکل می‌تواند انجـام شـود. یکـی بـه روش سـایبرگرین و دیگـری روش TaqMan prob. مزیـت روش سـایبرگرین نسبت به پروب این است که روش سایبرگرین مقـرون بـه صرفه‌تر است و هم چنین دردسرهای طراحی پروب را هم ندارد(۱۰).

لـی و همکـارانش در مطالعـه خـود بـرای سـنجش پرووایرال لـود ویـروس HTLV-1 از رده سـلولی MT2 بـه عنوان استاندارد استفاده کردند در این مطالعه به دلیل عـدم دسترسی به این سل لاین از روش کلونینـگ اسـتفاده شـد. رسـم منحنی اسـتاندارد بـا پلاسـمید نوترکیـب حـاوی ژن *Tax-1* نشان داد که این روش با شـیب خـط ۳/۳ و ۰/۹۹= R^2 قابل مقایسه بـا سـل لایـن MT2 جهـت رسـم منحنـی استاندارد در Real Time PCR می‌باشـد و نتـایج آن مشـابه نتـایج لـی و همکـارانش بـود. هـم چنـین دمـای ذوب در آزمایش با پلاسمید نوترکیب ۸۹ درجه سـانتی‌گـراد یعنـی نزدیـک بـا دمـای ذوب سـل لایـن MT2 یعنـی ۸۸ درجه سانتی‌گـراد بـود. دامنـه پـرووایـرال در ایـن مطالعـه ($۱۰^۱$copy/µL–$۱۰^۶$copy/µL) ذره ویروسی بود.

نتیجه‌گیری

این آزمایش دارای دامنه مناسبی جهت تعیین پرووایـرال لود از $۱۰^۶$ copy/µL تا $۱۰^۱$(حد پایین‌تر و بالاتر تشخیصی) در هر واکنش پرووایرال لود HTLV-I بود و می‌تواند جهت بررسی رابطه بین بار پـرو ویـروس و بیمـاری‌زایـی مـورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. بدین وسیله از مؤسسه به جهت حمایت مالی تشکر می‌گردد.

References:

1- Hedayati-Moghaddam MR, Fathimoghadam F, Mashhadi IE, Soghandi L, Bidkhori HR. Epidemiology of HTLV-1 in Neyshabour, northeast of Iran. Iran Red Crescent Med J 2011; 13(6): 424-7.
2- Kia V, Forouzandeh Moghadam M, Paryan M, Raz A, Mirab Samiee S. Simultaneous detection and identification of HBV and HTLV-I viruses by Melting curve analysis ofmultiplex Real-time PCR. Molecular and Biochemical Diagnosis Journal 2014; 1(1): 51-8. [Article in Farsi]
3- Anyanwu NCJ, Ella EE, Ohwofasa A, Aminu M. Re-emergence of human T-lymphotropic viruses in West Africa. Braz J Infect Dis 2018; 22(3): 224-34.
4- Lee TH, Chafets DM, Busch MP, Murphy EL. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. J Clin Virol 2004; 31(4): 275-82.
5- Watanabe T. Adult T-cell leukemia: molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1–infected T cells. Blood 2017; 129(9): 1071-81.
6- Saito M, Sejima H, Naito T, Ushirogawa H, Matsuzaki T, Matsuura E, *et al*. The CC chemokine ligand (CCL) 1, upregulated by the viral transactivator Tax, can be downregulated by minocycline: possible implications for long-term treatment of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. Virol J 2017; 14(1): 234.
7- Altamirano NA, Rocco C, Aulicino P, Sen L, Mangano A. Quantitation of HTLV-I proviral load by a real-time PCR assay using SYBR Green: comparison of two methods for DNA isolation. J Virol Methods 2010; 170(1-2): 160-4.
8- Masaki A, Ishida T, Suzuki S, Ito A, Narita T, Kinoshita S, *et al*. Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax-specific T-cell exhaustion in HTLV-1-infected individuals. Cancer Sci 2018; 109(8): 2383-90.
9- Waters A, Oliveira AL, Coughlan S, de Venecia C, Schor D, Leite AC, *et al*. Multiplex real-time PCR for the detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: addressing the issue of indeterminate HTLV results. J Clin Virol 2011; 52(1): 38-44.
10- Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, *et al*. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. J Neurovirol 1998; 4(6): 586-93.

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2019;16 (3): 194-200

Original Article

Design a Real Time PCR with SYBR Green for quantification of HTLV-1 proviral load for blood donors

Ghasemzadegan H.[1], Shahabi M.[1], Rezaie N.[2], Sharifi Z.[1]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran
[2]Institute of Endocrinology and Metabolism Research and Training Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

In Iran, Khorasan province is an endemic area for HTLV-1 virus. Considering the inability of serological tests to determine HTLV-1 in window period, their failure to confirm the indetermination results of western blot, and given the probability for HTLV-1 transfusion transmission, a SYBR green-based Real Time PCR was set to measure the HTLV-1 proviral load.

Materials and Methods

In this experimental study, using a cloning method and drawing a standard curve, the Real - Time PCR test was run to determine the HTLV-1 proviral load. At first, genomic DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells. Then, the PCR product of the Tax gene was placed in a cloning vector and recombinant plasmid was diluted by drawing a standard curve and a real-time PCR test was conducted using SYBR Green method.

Results

Cloning was performed using PCR product for tax gene, pTZ57/T vector, and *E. coli* (TG1 strain). Cloning accuracy was confirmed with Colony PCR and sequencing and used as the Real-Time PCR test standard. The standard curve was drawn with serial dilutions of recombinant plasmid containing *Tax-1* gene. The slope of the standard curve was 3.3 and $R^2 = 0.99$ which indicates the linearity and efficiency of the test reaction.

Conclusions

Real - Time PCR method is an appropriate method to measure HTLV-1 proviral load.

Key words: HTLV-1, Provirus, Real-Time PCR

Received: 18 Feb 2019
Accepted: 13 Aug 2019

Correspondence: Sharifi Z., PhD of Virology. Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052152; Fax: (+9821) 88601555
E-mail: *sharifiz@yahoo.com*