

Original Article

Design and In-Silico Evaluation of Specific Primers for the *HBZ* Gene of HTLV-1 to Establish a semi-nested PCR Method

Zandi M.¹, Sharifi Z.¹, Ajorloo M.¹

¹Biological Products and Blood Safety Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

HTLV-1 is the only known oncogenic human retrovirus, linked to ATL and HAM/TSP. Serological methods like ELISA and Western blot have sensitivity limitations, whereas PCR-based techniques offer more reliable detection. The *HBZ* gene, consistently expressed in ATL and asymptomatic carriers, correlates with proviral load. This study aimed to design specific primers targeting *HBZ* for a highly sensitive semi-nested PCR assay.

Materials and Methods

In a Cross-Sectional study, the *HBZ* gene sequence was identified using the NCBI GenBank database. Sequences from various viral isolates were aligned using MEGA6 bioinformatics software. Primers were designed from a conserved region shared by all HTLV-1 strains. Primer design and evaluation were conducted using Primer-BLAST, Primer3, OLIGO Analyze, SnapGene, and Gene Runner software. For the experimental phase, genomic DNA extracted from blood samples underwent a two-step semi-nested PCR. The PCR products were then analyzed using agarose gel electrophoresis.

Results

The primers designed for the *HBZ* gene successfully enabled the development of a semi-nested PCR assay. In silico predictions of primer performance were validated after synthesis and laboratory testing, with results aligning perfectly with the bioinformatics predictions.

Conclusions

This study demonstrates that the primers designed for the *HBZ* gene, combined with the semi-nested PCR method, provide an effective means for detecting the HTLV-1 provirus. Both the bioinformatics and laboratory results confirmed the specificity and sensitivity of the method, underscoring its potential for rapid and accurate HTLV-1 detection.

Key words: HTLV-1, Nested PCR, Leukemia

Received: 8 Jan 2025

Accepted: 9 Mar 2025

Correspondence: Sharifi Z., PhD of Virology, Professor of Biological Products and Blood Safety 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

طراحی و ارزیابی این سلیکو آغازگرهای اختصاصی ژن *HBZ* ویروس *HTLV-1* جهت راه اندازی روش *semi-nested PCR*

مهدی زندی^۱، زهره شریفی^۲، مهدی آجورلو^۳

چکیده

سابقه و هدف

ویروس لنفوئروپیک سلول T انسانی نوع ۱ (*HTLV-1*)، تنها رتروویروس سرطان‌زای انسانی است که با بیماری‌هایی نظیر لوسمی / لنفوم سلول T بالغین (*ATL*) و فلج اسپاستیک گرمسیری مرتبط می‌باشد. روش‌های سرولوژیکی مانند الایزا و وسترن بلات، ابزارهای رایجی برای تشخیص این ویروس هستند اما محدودیت‌هایی دارند. روش‌های مبتنی بر *PCR* با شناسایی مستقیم ماده ژنتیکی ویروس، حساسیت بالاتری ارائه می‌دهند. ژن *HBZ*، که توسط رشته منفی پروویروس *HTLV-1* کد می‌شود، نقش مهمی در سرطان‌زایی دارد و برخلاف سایر ژن‌های ویروسی، دچار جهش‌های مداوم نمی‌شود. در این مطالعه، ژن *HBZ* برای طراحی آغازگرهای اختصاصی و توسعه آزمایش *semi-nested PCR* بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه مقطعی، توالی ژن *HBZ* از ایزوله‌های گوناگون ویروس از پایگاه داده NCBI استخراج شد و با نرم‌افزار MEGA6 هم‌ردیف گردید. طراحی آغازگر از ناحیه محافظت شده مشترک بین تمامی سویه‌ها انجام شد. جهت ارزیابی آغازگرها از نرم‌افزارهای *OligoAnalyzer* و *SnapGene* استفاده گردید. در مرحله آزمایشگاهی، DNA ژنومی استخراج شده از نمونه‌های خون، مورد واکنش *semi-nested PCR* قرار گرفت و محصولات حاصل با روش الکتروفورز ژل آگارز ارزیابی گردید.

یافته‌ها

طراحی آغازگرهای ژن *HBZ* با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی به طور موفقیت‌آمیزی انجام شد. نتایج ارزیابی‌های این سلیکو پس از سنتز و آزمایش آغازگرهای طراحی شده، در آزمایشگاه تأیید شد و با نتایج پیش‌بینی شده بیوانفورماتیکی یکسان بودند.

نتیجه‌گیری

طراحی آغازگرهای ژن *HBZ* و توسعه آزمایش *semi-nested PCR* با موفقیت انجام شد. نتایج آزمایشگاهی، پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی را تأیید کرده و کارایی این روش را برای تشخیص دقیق و سریع ویروس نشان داد.

کلمات کلیدی: *HTLV-1*، *Nested PCR*، لوسمی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۱۹

۱- کارشناس ارشد زیست فناوری - مرکز تحقیقات فرآورده های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- مؤلف مسئول: PhD ویروس‌شناسی - استاد مرکز تحقیقات فرآورده های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

۳- PhD ویروس‌شناسی - استادیار مرکز تحقیقات فرآورده های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

مقدمه

ویروس لنفوتروپیک سلول T انسانی نوع ۱ (HTLV-1) به خانواده رتروویروس‌ها تعلق دارد و نخستین بار در دهه ۱۹۸۰ توسط پوئز کشف شد (۱). این ویروس با ادغام ژنوم خود در DNA میزبان، موجب عفونت‌های مزمن می‌گردد و ارتباط مستقیمی با بیماری‌های خطرناکی مانند لوسمی/لنفوم سلول T بالغین (ATL)، میلوپاتی مرتبط با HTLV-1 (HAM/TSP) و التهاب لایه میانی چشم دارد (۲). تخمین زده می‌شود ۲۵ میلیون نفر در سراسر جهان به HTLV آلوده هستند. میزان شیوع آن به‌طور ویژه در مناطق بومی مانند جنوب ژاپن، بخش‌هایی از آفریقا، آمریکای مرکزی، آمریکای جنوبی و خاورمیانه بالاست (۲). شهرهای مشهد، نیشابور و سبزوار در شمال شرقی ایران از جمله مناطق اندمیک ویروس به‌شمار می‌آیند (۳). انتقال ویروس از طریق راه‌های مختلفی مانند تماس جنسی، استفاده از سرنگ مشترک، انتقال خون و از مادر به نوزاد (معمولاً از طریق شیردهی) انجام می‌شود (۴). تشخیص زود هنگام و دقیق عفونت HTLV-1 برای مدیریت مؤثر بیماران و پیشگیری از گسترش آن اهمیت حیاتی دارد (۵). با این حال، روش‌های تشخیصی کنونی مانند الایزا و وسترن بلات، دارای محدودیت‌هایی از نظر حساسیت و اختصاصیت هستند. همچنین این روش‌ها در دوره کمون ویروس و در مراحل اولیه ابتلا، زمانی که تیتراژ آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن‌های ویروسی قابل اندازه‌گیری نیست، کارآمد نمی‌باشند (۵). مطالعه‌های گذشته نشان داده‌اند در بسیاری از موارد، با وجود مثبت بودن نتایج الایزا، نتایج آزمایش وسترن بلات که به عنوان آزمایش تأییدی استفاده می‌شود، نامشخص گزارش شده است. این موارد نشان‌دهنده نیاز به توسعه روش‌های دقیق‌تر و حساس‌تر است (۶). روش‌های مولکولی به دلیل توانایی تشخیص مستقیم مواد ژنتیکی ویروس در ژنوم میزبان، جایگاه ویژه‌ای در تشخیص عفونت‌های ویروسی پیدا کرده‌اند. PCR، یک روش مولکولی بسیار حساس و دقیق است که با استفاده از چرخه‌های دمایی، امکان تکثیر نواحی خاصی از DNA را فراهم می‌آورد (۶). آغازگرها در این فرآیند نقش کلیدی داشته و به عنوان نقطه شروع برای ساخت DNA عمل

می‌کنند. آغازگرها به‌طور خاص از سمت ۳' انتهای DNA نوکلئوتیدها را اضافه می‌کنند، این ویژگی بیوشیمیایی باعث می‌شود فرآیند تکثیر به صورت دقیق و قابل کنترل انجام شود. جهت طراحی آغازگرها، انتخاب نواحی محافظت شده در ژنوم و تنظیم دقیق توالی‌ها به منظور افزایش اختصاصیت و حساسیت، از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند. روش Nested PCR به عنوان یکی از روش‌های پیشرفته با دو مجموعه آغازگر خارجی و داخلی، توانسته است دقت و حساسیت بیشتری را در مقایسه با روش‌های معمولی PCR ارائه دهد (۷). در مطالعه‌های مختلف، آغازگرها غالباً برای ژن Tax ویروس طراحی شده‌اند، اما در برخی موارد به ویژه در موارد ابتلای جدید، با وجود مثبت بودن نتایج سرولوژیک، ژن Tax با استفاده از PCR شناسایی نشده است که می‌تواند به علت رخداد جهش‌های متعدد در این ژن باشد (۸). این امر نشان می‌دهد که بررسی چندین ناحیه از ژنوم ویروس برای افزایش دقت و اطمینان از تشخیص ضروری است.

در این مطالعه، طراحی و بهینه‌سازی آغازگرها با بهره‌گیری از نرم‌افزارهای پیشرفته بیوانفورماتیکی انجام شده است که امکان شناسایی و هدف‌گیری دقیق نواحی ژنی را فراهم کرده است. پروتئین HBZ از یک ناحیه بسیار محافظت شده رشته منفی پروویروس HTLV-1 کد می‌شود، که افزایش بیان آن با افزایش بار پروویروسی همراه می‌باشد. انتخاب ژن HBZ به دلیل نقش مهم آن در پاتوژنز و بیان آن در تمامی موارد ابتلا به لوسمی/لنفوم سلول T بالغین (ATL) و سایر بیماری‌های مرتبط با HTLV-1 انجام شده است. علاوه بر این، بیان ژن HBZ در حامل‌های آلوده به HTLV-1 نیز قابل تشخیص است. با توجه به اهمیت ژن HBZ، در این مطالعه با استفاده از روش‌های In Silico آغازگرهای اختصاصی برای ناحیه محافظت شده ژن HBZ ویروس HTLV-1 طراحی گردید. جهت ارزیابی روش semi-nested PCR، از نرم‌افزار SnapGene برای شبیه‌سازی عملکرد آغازگرها در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد و در نهایت تشخیص ویروس HTLV-1 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ناحیه محافظت شده ژن HBZ ویروس HTLV-1

در آزمایشگاه انجام گردید.

مواد و روش‌ها

۱- طراحی اینسلیکو آغازگر:

نرم‌افزارهای مختلفی جهت طراحی آغازگرهای مورد استفاده در انواع واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) وجود دارد. این نرم‌افزارها کاربردهای بسیاری از جمله تجزیه و تحلیل کامل DNA و پروتئین، پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین، طراحی آغازگر، مدل‌سازی مولکولی، توسعه استراتژی‌های شبیه‌سازی و تجزیه و تحلیل آنزیم‌های محدود کننده اندونوکلاز دارند.

شناسایی توالی هدف:

جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی، توالی‌های ژن HBZ از پایگاه داده NCBI GenBank استخراج شد. NCBI (National Center for Biotechnology Information) یکی از بزرگ‌ترین منابع اطلاعات بیولوژیکی است که دسترسی به توالی‌های ژنتیکی، داده‌های بیولوژیکی و ابزارهای تحلیل آن‌ها را فراهم می‌کند. این پایگاه داده شامل بانک گسترده‌ای می‌باشد که توالی‌های ژنی انواع ارگانیسم‌ها را ذخیره و به اشتراک می‌گذارد. علاوه بر این، این پایگاه داده به طور منظم اطلاعات خود را هر ۲۴ ساعت با دیگر پایگاه‌های داده معتبر از جمله EMBL (European Molecular Biology Laboratory) و DDBJ (DNA Data Bank of Japan) به اشتراک می‌گذارد تا داده‌ها و منابع به‌روز و جامع‌تر باشند. در این مطالعه، ۴۳ فایل توالی کامل ژن HBZ استخراج گردید که شامل توالی‌های مربوط به تمامی گونه‌های ویروس HTLV-1 از سراسر جهان، به ویژه گونه‌های ایرانی، برزیلی و آفریقایی بودند.

هم‌ردیفی توالی‌ها:

هم‌ردیفی توالی‌ها به منظور شناسایی نواحی محافظت شده و متغیر در ژنوم ویروس HTLV-1 انجام شد. این فرآیند به شناسایی سویه‌های مختلف ویروس و طراحی آغازگرهای دقیق‌تر برای آزمایش تشخیصی semi-nested PCR کمک می‌کند. در این مطالعه، با استفاده از نسخه ۶/۰

نرم‌افزار MEGA و به کمک الگوریتم ClustalW، توالی‌های کدکننده پروتئین HBZ از ۴۳ فایل مختلف با منشأهای جغرافیایی مختلف هم‌ردیف شدند، تا نواحی محافظت شده در این توالی‌ها شناسایی شوند. این نرم‌افزار به کمک الگوریتم‌های مختلف هم‌ردیف‌سازی مانند ClustalW و Clustal Omega، امکان هم‌ردیف‌سازی دقیق توالی‌های DNA را فراهم می‌آورد. ClustalW یک الگوریتم مشهور برای هم‌ردیف‌سازی چند تایی توالی‌ها است که از روشی مبتنی بر مقایسه جفتی استفاده می‌کند. این الگوریتم به طور خودکار توالی‌های DNA، RNA و پروتئین را با یکدیگر مقایسه و هم‌ردیف می‌کند تا تفاوت‌های بین آن‌ها مشخص شوند. در ClustalW، ابتدا جفت‌های توالی با استفاده از ماتریس‌های مشابهت مقایسه می‌شوند، سپس نتیجه این مقایسه‌ها به صورت ماتریس‌های فاصله برای تمام توالی‌ها نمایش داده می‌شود. در نهایت، بر اساس این ماتریس‌ها، بهترین ترتیب هم‌ردیفی انتخاب شده که کمترین فاصله را بین توالی‌ها ایجاد کند، با استفاده از هم‌ردیفی ۴۳ توالی استخراج شده، نواحی محافظت شده و مشترک بین تمامی سویه‌ها مشخص گردید که هدف اصلی طراحی آغازگر قرار گرفت.

طراحی آغازگرها:

پس از مشخص کردن توالی‌های مشترک حاصل از هم‌ردیفی مرحله قبل، طراحی آغازگر برای semi-PCR nested انجام شد. در روش Nested PCR دو مجموعه آغازگر استفاده می‌شود. یک جفت آغازگر خارجی که در واکنش اول مورد استفاده قرار می‌گیرد و محصول این مرحله، جهت افزایش اختصاصیت، توسط یک جفت آغازگر داخلی که قسمت‌های درونی‌تر ژن هدف را تکثیر می‌کنند در مرحله دوم PCR می‌شوند. در روش semi-nested PCR یک آغازگر در بین هر دو مرحله به طور مشترک مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای این مطالعه یک آغازگر پیشرو خارجی، یک آغازگر پیشرو داخلی و یک آغازگر پیرو که به طور مشترک در هر دو مرحله مورد استفاده قرار می‌گیرد، طراحی گردید. تمامی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner نسخه ۵,۰,۳۳ طراحی

آغازگر که برای اتصال و عملکرد صحیح پلیمرز ضروری است. در این مطالعه، آغازگرهای طراحی شده به منظور ارزیابی عدم تطابق با استفاده از ابزار OligoAnalyzer بررسی شدند. این ابزار امکان شناسایی هرگونه اتصال غیر اختصاصی، ساختارهای ثانویه، و ناسازگاری‌های احتمالی را فراهم کرد. همچنین در این مطالعه، به منظور بررسی اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده، از ابزار تحت وب NCBI-blastn استفاده گردید (جدول ۲).

توالی‌های آغازگرهای طراحی شده وارد این ابزار شدند و در برابر بانک داده‌های ژنومی موجود در NCBI بررسی شدند. هدف از این تجزیه و تحلیل، اطمینان از هم‌ردیفی آغازگرها با ژن هدف (HBZ) و شناسایی نواحی غیر اختصاصی احتمالی بود.

جدول ۲: خصوصیات آغازگرهای طراحی شده برای ژن HBZ

ویروس HTLV-1

آغازگر	طول قطعه	دمای ذوب	GC%
پیشرو خارجی	۲۲ bp	۶۶/۴	٪۴۵/۵
پیشرو داخلی	۲۱ bp	۶۴/۹	٪۶۰
پیرو مشترک	۲۱ bp	۶۷/۸	٪۴۷/۶

در نهایت، از نرم‌افزار SnapGene نسخه ۷,۲,۱ برای شبیه‌سازی عملکرد آغازگرها در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. قابلیت شبیه‌سازی ژل الکتروفورز این نرم‌افزار، برای بررسی طول قطعات تکثیر شده با آغازگر به کار رفت. این ویژگی امکان پیش‌بینی دقیق محصول PCR و مقایسه آن با نتایج واقعی آزمایشگاهی را فراهم کرد.

۲- بررسی در آزمایشگاه:

ساخت و ذخیره‌سازی آغازگرها:

برای اطمینان از صحت آغازگرها، اطلاعات مربوط به توالی آن‌ها پیش از ساخت دوباره مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، آغازگرهای طراحی شده، ساخته شدند (شرکت ندای فن، تهران، ایران). پس از ساخت، آغازگرها

شدند. این نرم‌افزار قابلیت‌های متنوعی برای طراحی، تجزیه و تحلیل و ویرایش توالی‌های DNA دارد. از جمله ویژگی‌های برجسته آن می‌توان به طراحی آغازگر با توجه به معیارهای مختلف مانند طول، درصد GC و دمای ذوب (Tm) اشاره کرد. نرم‌افزار Gene Runner با پیش‌بینی ساختار ثانویه (مانند ساختارهای حلقه‌ای) تأثیر زیادی در طراحی آغازگر دارد. اگر ساختارهای ثانویه به درستی پیش‌بینی شوند، می‌توان از تشکیل دایمرهای آغازگر یا تعاملات جانبی که ممکن است کارایی یا دقت واکنش PCR را کاهش دهند، جلوگیری کرد. این قابلیت پیش‌بینی ساختاری به ویژه در طراحی آغازگرها برای نواحی پیچیده ژنی اهمیت زیادی دارد. جدول زیر آغازگرهای طراحی شده برای ژن HBZ جهت راه‌اندازی آزمایش semi-nested PCR را نشان می‌دهد (جدول ۱).

جدول ۱: توالی آغازگرهای طراحی شده برای ژن HBZ ویروس

HTLV-1

توالی آغازگرهای طراحی شده	طول قطعه تکثیر شونده
پیشرو خارجی	۴۹۴ bp
پیشرو داخلی	۱۰۶ bp
پیرو مشترک	-

ارزیابی آغازگرها:

آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار OligoAnalyzer تحلیل شدند. این نرم‌افزار به بررسی پارامترهای مهمی مانند دمای ذوب (Tm)، تشکیل ساختارهای سنجاق سری (Hairpin)، و ایجاد دایمر (Self-dimerization) پرداخت. عدم تطابق در توالی آغازگر (Mismatch) و هدف یکی از عوامل مهم کاهش کارایی واکنش PCR است، به ویژه در ناحیه ۳'

تحلیل محصول PCR:

محصولات PCR جهت بررسی صحت و کیفیت، تحت تحلیل ژل الکتروفورز با ژل آگارز ۱٫۵٪ قرار گرفتند. برای جداسازی قطعات، از ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه استفاده شد. در مرحله اول semi-nested PCR، که طول قطعه مورد نظر ۴۹۳ جفت باز بود، محصولات با استفاده از نشانگر ۱۰۰ bp الکتروفورز شدند. در مرحله دوم، به دلیل کوتاه تر بودن قطعه (۱۰۶ جفت باز)، نشانگر ۵۰ bp برای ارزیابی به کار رفت. جهت آشکارسازی، از رنگ Green Viewer استفاده شد که در مرحله آماده سازی ژل به آن افزوده شده بود. بررسی نهایی نتایج با دستگاه ژل داک و نرم افزار مربوطه انجام شد.

جدول ۳: حجم مواد مورد نیاز در هر دو مرحله آزمایش semi-nested PCR

حجم	مواد
۱۰ میکرولیتر	مستر میکس آمپلیکون ۲x
۰/۵ میکرولیتر	آغازگر جلوبرنده (۱۰ میکرومولار)
۰/۵ میکرولیتر	آغازگر معکوس (۱۰ میکرومولار)
۷ میکرولیتر	آب مقطر استریل
۲ میکرولیتر	DNA الگو (۱۰۰-۱ نانوگرم)
۲۰ میکرولیتر	حجم نهایی

جدول ۴: برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای هر دو مرحله آزمایش semi-nested PCR

مرحله	دما	زمان	تعداد چرخه
دناتوراسیون اولیه	۹۵ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه	۱
دناتوراسیون	۹۵ درجه سانتیگراد	۴۵ ثانیه	۴۰
آنیلینگ	۶۲ درجه سانتیگراد	۴۵ ثانیه	
گسترش	۷۲ درجه سانتیگراد	۴۵ ثانیه	
گسترش نهایی	۷۲ درجه سانتیگراد	۵ دقیقه	۱

با غلظت مشخصی (۱۰۰ میکرومولار) در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند تا از تخریب و کاهش کارایی آن‌ها در فرایندهای بعدی جلوگیری شود.

استخراج DNA از نمونه‌ها:

در این مطالعه، از ۵ نمونه خون اهداکننده HTLV-1 منفی، ۵ نمونه خون اهداکننده HTLV-1 مثبت که غربالگری اولیه برای شناسایی ویروس HTLV-1 با استفاده از آزمایش ELISA انجام شده بود و نتایج این آزمایش توسط روش وسترن بلات با کیت دیاگنوستیکا MP تأیید گردیده بود و ۴ نمونه مربوط به افراد مبتلا به سایر ویروس‌های انسانی (HIV، HCV، HBV و HSV)، استفاده شد. DNA ژنومی از بافی کوت نمونه خون افراد در لوله‌های حاوی EDTA با استفاده از کیت DNJia plus (Blood and Cell kit (LOT: 506923112710040) تولید شرکت روژه تکنولوژی استخراج شد. غلظت DNA استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ اندازه‌گیری گردید.

انجام واکنش PCR:

واکنش PCR با استفاده از مستر میکس آماده از شرکت آمپلیکون (دانمارک) و به وسیله آغازگرهای طراحی و سنتز شده انجام شد. مقدار DNA الگو در هر واکنش به صورت دقیق تنظیم گردید. برای بهینه‌سازی دمای اتصال آغازگرها و جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی، از تنظیمات ترموسایکلر با گرادیان شیب غلظتی و روش Touchdown PCR استفاده شد. این روش به صورت مرحله‌ای دما را کاهش داد. در ابتدا دمای بالا را برای افزایش اختصاصیت آغازگرها به کار گرفته و در نهایت دما بهینه تثبیت گردید. مراحل دمایی برای هر دو مرحله از واکنش semi-nested PCR مشابه بود و شامل واسرشت اولیه، چرخه‌های تکراری واسرشت، اتصال و گسترش و در نهایت گسترش نهایی بود. برای دستیابی به نتایج دقیق و قابل اعتماد، تنظیمات دمایی و غلظت‌ها بر اساس آزمایش‌های متعدد اولیه، تعیین و بهینه‌سازی گردید (جدول ۳ و ۴).

یافته‌ها

۱- نتایج بیوانفورماتیکی:

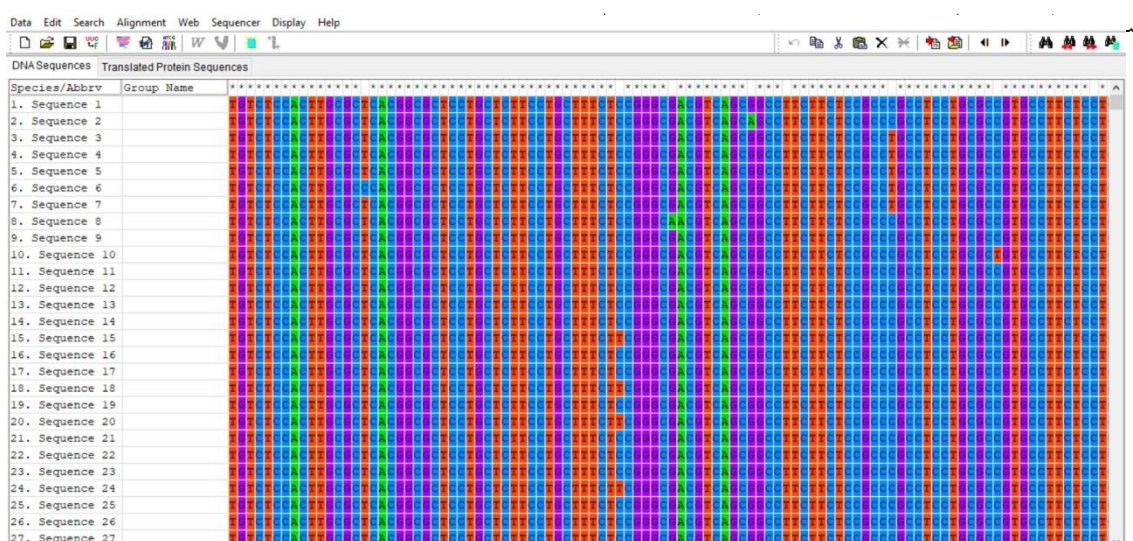
برای بررسی شباهت‌ها و تفاوت‌های توالی‌ها، از ابزار هم ردیفی چندتایی MEGA6 استفاده شد. نتایج هم‌ردیفی نشان داد که ناحیه مورد نظر برای طراحی آغازگرها در ژن HBZ پس از هم ردیفی بیشترین شباهت را در میان ۴۳ توالی مختلف داشت. این ناحیه به دلیل حفظ ویژگی‌های بیولوژیکی در گونه‌های مختلف ویروس، به عنوان توالی هدف انتخاب شد (شکل ۱). پس از انتخاب ناحیه هدف، طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner (ver.5.0.33) انجام شد و ویژگی‌های آن‌ها شامل دمای ذوب (Tm)، طول آغازگر، غلظت GC و ساختار ثانویه بررسی گردید. به منظور ارزیابی بیشتر آغازگرهای طراحی شده، آغازگرها با استفاده از ابزار blastn در پایگاه داده NCBI بررسی شدند. نتایج BLAST نشان داد که این آغازگرها هم‌پوشانی قابل توجهی با توالی‌های ژنومی سایر ویروس‌ها یا انسان‌ها ندارند. به ویژه در مقایسه با ویروس‌های هم‌خانواده یا مشابه، تطابقی با توالی‌های غیر هدف پیدا نشد.

این نتیجه نشان‌دهنده دقت بالا و خاصیت انتخابی آغازگرها برای شناسایی دقیق ویروس HTLV-1 بود. جهت پیش‌بینی عملکرد PCR، از نرم‌افزار SnapGene استفاده

semi-nested PCR طراحی گردید. برای مرحله اول که طول قطعه هدف ۴۹۳ نوکلئوتید بود، پیش‌بینی نرم افزار نشان داد که محصول PCR در شرایط آزمایشگاهی به درستی تکثیر خواهد شد. هم‌چنین مرحله دوم، که هدف ۱۰۶ نوکلئوتید بود، به دقت شبیه‌سازی شد (شکل ۳).

۲- نتایج آزمایشگاهی:

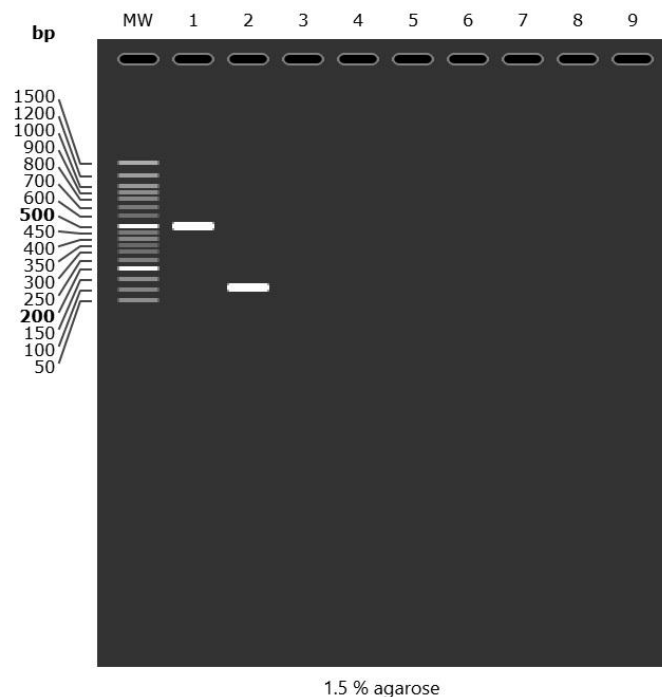
نتایج آزمایشگاهی تأیید کرد که باندهای مورد نظر در ژل الکتروفورز برای نمونه‌های مثبت در هر دو مرحله PCR قابل شناسایی‌اند. در مرحله اول، باند مربوط به قطعه ۴۹۳ جفت بازی و در مرحله دوم، باند مربوط به قطعه ۱۰۶ جفت بازی به وضوح شناسایی شدند (شکل ۴). نمونه مثبت به طور صحیح در هر دو مرحله PCR مثبت تشخیص داده شدند و این امر صحت و دقت بالای روش طراحی شده را تأیید کرد. هم‌چنین، در آزمایش بر روی نمونه‌های منفی که شامل نمونه‌های اهداکنندگان سالم که از نظر ویروس HTLV-1 منفی بودند هم‌چنین نمونه‌های افراد مبتلا به سایر ویروس‌های انسانی (HIV، HCV، HBV و HSV) نتایج تمامی موارد منفی گزارش شد، که نشان‌دهنده ویژگی بالای آزمایش و عدم تقاطع با ویروس‌های دیگر بود.



شکل ۱: نتایج هم‌ردیفی ژن HBZ با استفاده از نرم‌افزار MEGA6. بر اساس هم‌ردیفی توالی‌های حفاظت شده در تمام ایزوله‌ها برای طراحی آغازگر انتخاب شدند.

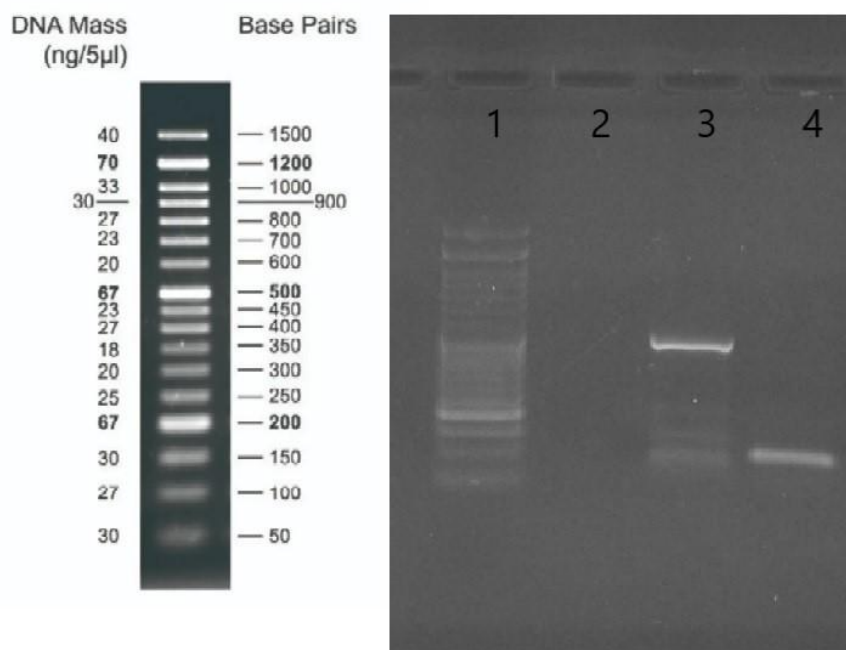
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(50) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453097.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(65) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453132.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate MhD ATL3, complete genome	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	9035	MH399767.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(39) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453098.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate ATL MhD1, complete genome	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	9035	MH392265.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(2) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453143.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(37) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453140.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(5) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453103.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(77) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453126.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(87) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453122.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate MhD ATL5, complete genome	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	9035	MH399769.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(45) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453128.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(16) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	621	MN453099.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate MhD ATL2, complete genome	Human T-cell leu...	811	811	82%	0.0	99.33%	9035	MH395864.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(92) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	809	809	80%	0.0	99.77%	621	MN453137.1
✓	Human T-cell leukemia virus type I isolate IR(88) bZIP factor (HBZ) gene, complete cds	Human T-cell leu...	806	806	82%	0.0	99.11%	621	MN453121.1

شکل ۲: نتایج بلاست آغازگرهای طراحی شده برای ژن *HBZ* توسط نرم‌افزار آنلاین NCBI-BLAST. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، آغازگرهای طراحی شده با بیش از ۹۹٪ موارد ژن *HBZ* ویروس HTLV-1 تشابه داشتند.



1.5 % agarose

شکل ۳: تصویر ارائه شده توسط نرم‌افزار SnapGene، شبیه‌ساز ژل الکتروفورز محصول هر دو مرحله آزمایش semi-nested PCR با آغازگرهای طراحی شده در کنار نشانگر ۵۰ bp، ستون ۱ مربوط به قطعه ۴۹۳ جفت بازی مرحله اول و ستون ۲ مربوط به قطعه ۱۰۶ جفت بازی مرحله دوم آزمایش semi-nested PCR.



شکل ۴: تصویر ژل الکتروفورز محصول هر دو مرحله آزمایش semi-nested PCR با آغازگرهای طراحی شده از چپ به راست ستون اول مربوط به نشانگر ۵۰ bp، ستون دوم مربوط به قطعه ۴۹۳ جفت بازی مرحله اول و ستون سوم مربوط به قطعه ۱۰۶ جفت بازی مرحله دوم آزمایش semi-nested PCR

بحث

این مطالعه پتانسیل استفاده از ژن HBZ را به عنوان یک هدف کارآمد جهت تشخیص ویروس HTLV-1 نشان داد و می تواند در طراحی آزمایش های PCR کمی و کیفی به کار رود. هم چنین، این مطالعه استفاده از روش semi-nested PCR راه اندازی شده را به عنوان یک ابزار تشخیصی حساس و اختصاصی جهت بررسی پروویروس HTLV-1 پیشنهاد می کند. در هر دو مرحله آزمایش PCR، محصول تولیدی در اندازه های پیش بینی شده (۴۹۳ و ۱۰۶ جفت باز) در تمام نمونه های مثبت مشاهده شدند، در حالی که در تمامی نمونه های منفی و نمونه های حاوی سایر ویروس های شایع انسانی هیچ واکنش مثبتی دیده نشد.

در بسیاری از مطالعه ها، طراحی آغازگرها به عنوان ابزاری مهم برای تشخیص دقیق عفونت های مختلف مورد توجه قرار گرفته است. از آغازگرها در شناسایی ویروس ها و باکتری ها از طریق روش های مبتنی بر PCR استفاده می شوند. در مطالعه ای که توسط بیگوم و همکاران منتشر شده است، به طراحی آغازگرهای ویژه برای شناسایی انواع

مختلف ویروس دلتا SARS-CoV-2 پرداخته اند. در این مطالعه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی توالی های محافظت شده ژنوم ویروس را شناسایی کرده و به طراحی آغازگرهای مناسب برای تشخیص سریع تر این ویروس پرداخته اند. هم چنین از داده های بیوانفورماتیکی برای بهینه سازی انتخاب آغازگرها استفاده کردند تا دقت و حساسیت آزمون PCR بهبود یابد (۹).

این مطالعه از نظر استفاده از روش های بیوانفورماتیکی و طراحی آغازگرهای هدفمند، مشابه مطالعه کنونی بود و در هر دو مطالعه، هدف ارتقاء دقت تشخیص از طریق طراحی آغازگر برای نواحی محافظت شده ژنوم ویروس بود. اما تفاوت اصلی هدف این دو مطالعه در این است که بیگوم و همکاران، بیشتر بر روی انتخاب آغازگرهایی برای شناسایی و تمیز دادن انواع مختلف ویروس دلتا SARS-CoV-2 تمرکز کرده اند، در حالی که در مطالعه ما، هدف طراحی آغازگر برای ناحیه ژنومی HBZ ویروس HTLV-1 بود، که در طول زمان کم تر در معرض جهش قرار می گیرند و شناسایی دقیق آن می تواند چالش های مرتبط با

در مواردی با بارویروسی پایین ممکن است عملکرد ضعیفی داشته باشد. در حال حاضر آزمایش‌های تشخیصی PCR کمی و کیفی اکثراً بر پایه تشخیص و تکثیر ژن *TAX* ویروس HTLV-1، طراحی شده‌اند. اگر چه این ژن مختص ویروس HTLV بوده و انتظار می‌رود که ژنوم ویروس با اختصاصیت بالا تکثیر شود، مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که در مواردی ژن *TAX* توسط روش‌های مولکولی قابل شناسایی نیست که می‌تواند منجر به تولید نتایج منفی کاذب یا نامشخص گردد (۸، ۱۱).

با توجه به این مشکلات، استفاده از ژن‌های دیگری که در برابر جهش‌های توالی مقاوم‌تر هستند و کمتر تحت تأثیر تغییرات قرار می‌گیرند، می‌تواند در افزایش دقت و حساسیت روش‌های تشخیصی مؤثر باشد. یکی از این ژن‌ها، *HBZ* می‌باشد. پروتئین *HBZ* از روی رشته منفی پروویروس کد می‌شود و به طور ثابت در طول عفونت ویروسی بیان می‌گردد. این خصوصیات باعث شده‌اند که ژن *HBZ* به عنوان یک هدف مناسب برای طراحی آغازگرها در تشخیص HTLV-1 مورد توجه قرار گیرد. در این مطالعه، به منظور بهبود دقت تشخیص و رفع مشکلات مربوط به جهش‌ها و میس‌مچ‌های موجود در آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های *TAX* و *LTR*، از ژن *HBZ* به عنوان هدف اصلی برای طراحی آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. پیشنهاد می‌شود در مطالعه‌های آینده، بررسی آغازگرهای طراحی شده، در مقیاس‌های بالینی و در جمعیت‌های بزرگ‌تر انجام شود. هم‌چنین، بررسی پرووایرال لود و بیان ژن *HBZ* در نمونه‌های افراد مبتلا می‌تواند در درک بهتر دلایل ایجاد جواب‌های نامشخص آزمایش وسترن بلات مفید باشد.

نتیجه‌گیری

استفاده از ژن *HBZ* برای تشخیص عفونت ویروس HTLV، به دلیل نقش آن در پاتوژنز ویروس و خصوصیات منحصر به فرد آن، به عنوان نقطه تمایز این مطالعه با تحقیقات پیشین که سایر بخش‌های ژنوم ویروس را بررسی کرده‌اند، است. نتایج به دست آمده در هر دو مرحله بررسی اینسلیکو و بررسی در محیط آزمایشگاه

تشخیص قطعی ویروس HTLV-1 را برطرف کند. در مطالعه‌ای که توسط ساندرا گالگو و همکاران انجام شد، از ژن‌های *tax/rex* برای شناسایی پروویروس‌های HTLV-1 و HTLV-2 در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی استفاده شد. این مطالعه نشان داد که آزمایش Nested PCR دقت و حساسیت بالاتری در شناسایی این ویروس‌ها نسبت به روش‌های دیگر PCR دارد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از آزمایش Nested PCR می‌تواند به ویژه برای تشخیص HTLV در مناطق غیر اندمیک با بار ویروسی پایین و در بیماران با علائم خفیف یا مراحل اولیه عفونت بسیار مفید باشد. هم‌چنین، این روش در مقایسه با PCR تک مرحله‌ای توانایی تشخیص دقیق‌تر پروویروس را در نمونه‌هایی با غلظت کم DNA و حتی نمونه‌هایی با جواب‌های وسترن بلات نامشخص فراهم می‌کند (۱۰).

در مطالعه‌ای که توسط کاترینو دو اروجو و همکاران انجام شد، در ۶۹ نمونه خون ژن‌های *env*، *LTR* و *TAX* ویروس HTLV با آزمایش PCR ارزیابی گردید. نتیجه این مطالعه نشان داد در برخی از موارد در نمونه‌هایی که جواب وسترن بلات نامشخص دارند، ژن *TAX* قابل شناسایی نبوده و می‌تواند علت ایجاد جواب منفی کاذب یا نامشخص باشد، در حالی که سایر ژن‌های ویروسی به طور حفاظت شده وجود دارند و در نتیجه برای تشخیص ویروس HTLV نیاز است که بیش از یک بخش از ناحیه ژنی ویروس را جستجو کرد (۸).

بیشتر روش‌های مولکولی تشخیصی HTLV-1 بر اساس شناسایی ژن‌هایی هم‌چون *TAX* و *LTR* طراحی شده‌اند که به دلیل نقش اساسی این ژن‌ها در تکثیر و پاتوژنز ویروس، در شناسایی ویروس بسیار مفید هستند. با این حال، استفاده از این ژن‌ها در تشخیص HTLV-1 محدودیت‌هایی دارد که می‌تواند بر دقت و حساسیت نتایج تأثیر بگذارد. انتخاب ژن‌های *LTR* و *env* به عنوان مناطقی جهت طراحی آغازگر ممکن است اختصاصیت لازم را نداشته باشد و استفاده از این نواحی با احتمال ایجاد واکنش متقاطع با سایر رتروویروس‌ها همانند HIV-1 همراه می‌باشد که می‌تواند دقت نتایج را کاهش دهد. هم‌چنین

است.

نقش نویسندگان

مهدی زندی: نگارش اولیه مقاله و تجزیه و تحلیل اطلاعات

دکتر زهره شریفی: طراحی مطالعه، نظارت بر اجرای طرح و نگارش نهایی مقاله

دکتر مهدی آجورلو: نظارت بر اجرای طرح پژوهشی و نگارش مقاله

تشکر و قدردانی

این تحقیق حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد زیست فناوری مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی انتقال خون ایران است. بدین وسیله از این مؤسسه به خاطر حمایت های مالی آن تشکر می شود.

نشان می دهد که آغازگرهای طراحی شده برای ژن HBZ قادر به شناسایی ژن هدف بوده و در تمایز نمونه های مثبت از منفی کارآمد است. هم چنین آزمون semi-nested PCR طراحی شده در این مطالعه می تواند به عنوان یک روش مؤثر برای شناسایی عفونت ویروس HTLV مورد استفاده قرار بگیرد.

حمایت مالی

این پروژه توسط مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین مالی شده است.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه به تأیید کمیته اخلاق مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون رسیده است (کد اخلاق: IR.TMI.REC.1402.017).

عدم تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع در مطالعه حاضر وجود نداشته

References:

- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(12):7415-9.
- Baratella M, Forlani G, Raval GU, Tedeschi A, Gout O, Gessain A, *et al.* Cytoplasmic Localization of HTLV-1 HBZ Protein: A Biomarker of HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). *PLoS egl Trop Dis* 2017;11(1):e0005285.
- Hedayati-Moghaddam MR. A Systematic Review for Estimation of HTLV-I Infection in the Blood Donors of Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 2013;16(3):196-201.
- Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene.* 2005;24(39):6058-68.
- Kia V, Forouzandeh Moghadam M, Paryan M, Raz A, Mirab cation of HBV and HTLV-I viruses by Melting curve Samiee S. Simultaneous detection and identifi analysis of multiplex Real-time PCR. *Molecular and Biochemical Diagnosis Journal* 2014;1(1):51-8.
- Cánepa C, Salido J, Ruggieri M, Fraile S, Pataccini G, Berini C, *et al.* Low Proviral Load is Associated with Indeterminate Western Blot Patterns in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infected Individuals: Could Punctual Mutations be Related? *Viruses* 2015;7(11):5643-58.
- Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc.* 2019 Feb 1;2019(2).
- Caterino-de-Araujo A, Campos KR. Defective particles of human T-lymphotropic virus and negative results in molecular assays. *Infect Genet Evol* 2021;96:105141.
- Begum KT, Wnaiza J, Absar N, Az S. In Silico Primer Design for Accurate Detection of SARS-CoV-2 Delta Variants. *JBCG* 2022;5:104.
- Gallego S, Mangano A, Gastaldello R, Sen L, Medeot S. Usefulness of a Nested-polymerase chain reaction for molecular diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I/II. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004 Jun;99(4):377-80.
- Blanco S, Frutos MC, Balangero MC, Gallego SV. Human T-Lymphotropic virus type 1 infection in absence of tax gene: A challenge for molecular diagnosis. *Infect Genet Evol* 2021;90:104765.