

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 آزمایش Real – 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 $R^2 = 0/99$ بوده که نشان‌دهنده خطی بودن و کارایی واکنش آزمایش می‌باشد.

نتیجه‌گیری

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

کلمات کلیدی: ویروس HTLV-1، پروویروس، Real - Time PCR

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۹

تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۲۲

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

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 ۰/۶-۲/۱ 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 می‌تواند 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 اهدا کنندگان، 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 HTLV-1 Associated Myelopathy/ Tropical (HAM/TSP) (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، پروویروس‌ها به وسیله اینتگرز 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 تیترا پایین است) نمی‌باشند (۲). هم چنین به علت خطر انتقال ویروس HTLV-1 از راه خون و فرآورده‌های خونی و با توجه به آلودگی اهدا کنندگان خون در مناطق اندمیک با این ویروس برای دستیابی به تعداد کپی پرو ویروس و وضعیت آن در پیشرفت بیماری در

اهدا کنندگان، وجود یک آزمایش کمی و مولکولی برای تعیین پرووایرال لود در اهدا کنندگان خون نیاز است (۲). علاوه بر این، آزمایش PCR برای تایید جواب‌های نامشخص وسترن بلات نیز کارایی 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 (۴، ۵)، بنابراین به جای RNA ویروس برای تعیین پرووایرال لود ویروس، از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که پروویروس HTLV-1 را حمل می‌کنند استفاده می‌شود (۵). DNA ژنومی از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی که پروویروس 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 اهدا کنندگان 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 الیزا (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 الیزا با وسترن بلات تایید شد. سپس استخراج DNA از نمونه‌های باقی‌کوت اهدا کنندگان 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 (جدول 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 <i>Tax</i>	TCGAAACAGCCCTGCAGATA
آغازگر بیرونی معکوس ژن <i>Tax</i>	TGAGCTTATGATTTGTCTTCA
آغازگر درونی جلوبرنده ژن <i>Tax</i>	ATACAAAGTTAACCATGCTT
آغازگر درونی معکوس ژن <i>Tax</i>	AGACTCAGAGCCTTAGTCT

جدول ۲: جدول زمانی و دمایی آزمایش Nested PCR

مرحله	دما	زمان	چرخه
دنا تورا سیون اولیه	۹۴	۵ دقیقه	۱
دنا تورا سیون	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

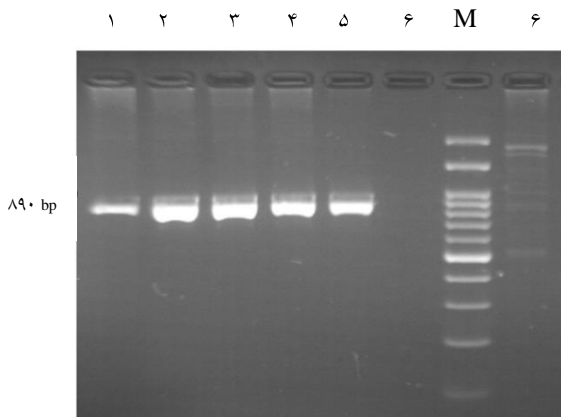
نام آغازگر	توالی آغازگر	Amplicon Length
HTLV-1 جلوبرنده	5'-CCCACAATCCAACCAGCTCAG-3'	۱۸۵ bp
HTLV-1 معکوس	5'-GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT-3'	
GAPDH جلوبرنده	5'-ACGCATTTGGTCGTATTGGG-3'	۲۶۴ bp
GAPDH معکوس	5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3'	

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.

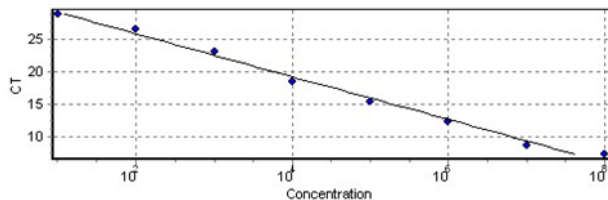
کلونینگ و واکنش اتصال (Ligation Reaction) محصول PCR با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR (آلمان، رُوش) انجام شد. سپس کلونینگ ژن *Tax-1* با استفاده از کیت کلونینگ فرمتناز در پلاسمید pTZ57R/T صورت پذیرفت. واکنش اتصال قطعات محصول PCR با پلاسمید pTZ57R/T طبق روش کیت انجام شد. برای انتقال پلاسمید نو ترکیب به باکتری *E.coli* مستعد سوش *TGI* (Transformation) از روش شوک حرارتی استفاده شد. استخراج پلاسمید نو ترکیب 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 نو ترکیب خالص شده به همراه آغازگرهای ژن *Tax* به شرکت ژن فن آوران 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 نو ترکیب محاسبه شد سپس بر روی پلاسمید نو ترکیب، رقت سازی (۱۰^۹ copy/μL - ۱۰^۱ copy/μL) انجام شد و آزمایش Real - Time PCR با استفاده از چرخه دمایی

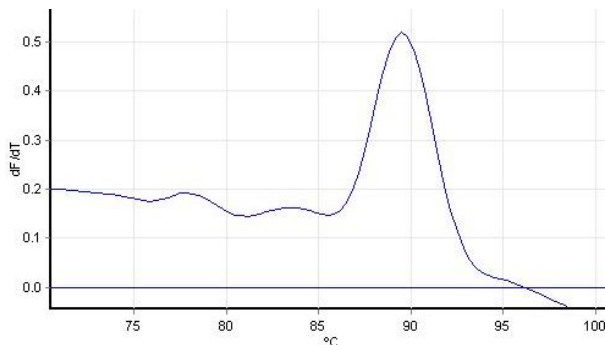
آن >0.98 بود (نمودار ۱). جهت بررسی اختصاصی بودن واکنش‌ها از منحنی ذوب استفاده شد که دمای ۸۹ درجه سانتی‌گراد نشان داد واکنش آزمایش اختصاصی می‌باشد (نمودار ۲).



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 نو ترکیب ($10^1 \text{ copy}/\mu\text{L}$ - $10^6 \text{ copy}/\mu\text{L}$)



نمودار ۲: نمودار منحنی استاندارد Real Time PCR با استفاده از رقت‌های مختلف پلاسمید نو ترکیب ($10^1 \text{ copy}/\mu\text{L}$ - $10^6 \text{ copy}/\mu\text{L}$)

منحنی استاندارد رسم شد (جدول ۴).

جهت ولیدیشن Real - Time PCR مراحل زیر انجام شد: حساسیت (Analytical Sensitivity): سه رقت از استاندارد ($10^3 \text{ copy}/\mu\text{L}$ - $10^1 \text{ copy}/\mu\text{L}$) در سه روز مختلف به صورت تکرار ۸ تایی آزمایش استفاده شد.

خطی بودن (Linearity): پنج رقت از استاندارد PTZ- HTLV-1 ($10^6 \text{ copy}/\mu\text{L}$ - $10^2 \text{ copy}/\mu\text{L}$) به صورت پنج تایی در یک روز آزمایش شد. دقت (Precision): شش رقت از استاندارد ($10^6 \text{ copy}/\mu\text{L}$ - $10^1 \text{ copy}/\mu\text{L}$) به صورت شش تایی در یک روز برای اینترا-اسی. کارایی (Efficiency): آمپلیفیکاسیون می‌باشد که با فرمول $E = 10^{-1/\text{slope}}$ محاسبه می‌شود. شیب خط و R^2 (Slope): در واقع خطی بودن نتایج را نشان می‌دهد.

جدول ۴: جدول زمان بندی Real Time PCR

Cycle	Cycle Point	
۱	۱۵ دقیقه	۹۵ °C
۴۵	۳۰ ثانیه	۹۵ °C
	۳۰ ثانیه	۵۸ °C
	۴۵ ثانیه	۷۲ °C
آنالیز منحنی ذوب	ثانیه/۰/۳ °C	۶۵ °C - ۹۸ °C

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 نو ترکیب آزمایش PCR و الکتروفورز انجام شد. هم چنین پلاسمید نو ترکیب تعیین سکانس شد و کلونینگ تایید گردید. در نهایت آزمایش Real - Time PCR بر روی رقت‌های مختلف پلاسمید نو ترکیب انجام شد. حساسیت (Analytical Sensitivity) در سه رقت از استاندارد ($10^3 \text{ copy}/\mu\text{L}$ - $10^1 \text{ copy}/\mu\text{L}$) در سه روز مختلف به صورت تکرار ۸ تایی آزمایش انجام شد که قادر به تشخیص $10^1 \text{ copy}/\mu\text{L}$ ذره ویروسی بود. خطی بودن و کارایی آمپلیفیکاسیون دارای شیب خط، برابر $3/3$ و R^2

بحث

در مقالات متعددی از سنجش لود ویروس به عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی و پایش بیماران تحت درمان نام برده شده است (۶، ۷). چون پرووایرال لود یک فاکتور مهم در ایجاد و پیشرفت بیماری‌های مرتبط با HTLV-1 است، نیاز به انجام یک آزمایش کمی احساس می‌شود. آیکو ماساکی و همکاران در مقاله خود بیان کردند که پرووایرال لود بالاتر در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به عنوان یک فاکتور خطر در ایجاد ATL می‌باشد.

هم چنین ارتباط مستقیم و چشمگیری بین پرووایرال لود در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و میزان بیان PD-1 (Program Cell Death Protein) و کاهش عملکرد Tax-CTL وجود دارد (۸).

واترز و همکاران در مطالعه خود بیان کردند که آزمایش qPCR (Quantitative PCR) ولید شده، به عنوان یک آزمایش کارآمد که قادر به اندازه‌گیری پرووایرال لود باشد و هم چنین قابلیت تکرارپذیری داشته باشد، مورد نیاز است. از آن جایی که هنوز یک بیومارکر اختصاصی برای پیش‌بینی پیشرفت بیماری در افراد بدون علامت وجود ندارد و از طرفی میزان آنتی‌بادی اختصاصی علیه HTLV-1 با پرووایرال لود ویروس همبستگی دارد، می‌توان از پرووایرال لود به عنوان روشی برای پیش‌بینی نتایج عفونت و پیشرفت بیماری استفاده نمود (۹).

به طور روتین از روش الیزا برای غربالگری اهداکنندگان خون استفاده می‌شود و به کمک وسترن بلات نتایج آن تایید می‌گردد. آزمایش الیزا حساسیت بالا دارد ولی ممکن است اختصاصیت بالایی نداشته باشد و با آنتی‌ژن‌های دیگری واکنش متقاطع بدهد. وسترن بلات نیز یک روش سنجش ایمنی بر پایه آنتی‌بادی می‌باشد که به عنوان آزمایش تاییدی در کسانی که از نظر آنتی‌بادی با آزمایش الیزا مثبت بوده‌اند استفاده می‌شود. وسترن بلات و روش‌های مبتنی بر سنجش آنتی‌بادی در بیماران با سرکوب یا ضعف سیستم ایمنی، در کسانی که در دوره پنجره هستند، در عفونت‌های اخیر و در نوزادان روش مناسبی نمی‌باشد. در روش وسترن بلات گاهی جواب‌ها نامشخص است که میزان این جواب‌ها از ۰/۲ در مناطق غیر اندمیک تا ۰/۵۰ در

مناطق اندمیک متغیر است. این جواب‌های بدون پاسخ ممکن است نشان‌دهنده عفونت واقعی HTLV-1، مثبت کاذب و یا تغییرات سرمی باشد. پس برای رفع این مشکل نیاز به آزمایش‌های مولکولی می‌باشد. روش‌هایی که بر اساس ازدیاد DNA است مثل PCR و Real Time PCR روش‌های مناسبی هستند. مزیت روش qPCR آلودگی 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 روش‌های متداول کشت، سرعت بالاتر و قیمت مناسب‌تر دارد. روش Real Time به دو شکل می‌تواند انجام شود. یکی به روش سایبرگرین و دیگری روش TaqMan prob. مزیت روش سایبرگرین نسبت به پروب این است که روش سایبرگرین مقرون به صرفه‌تر است و هم چنین در دسرهای طراحی پروب را هم ندارد (۱۰).

لی و همکارانش در مطالعه خود برای سنجش پرووایرال لود ویروس HTLV-1 از رده سلولی MT2 به عنوان استاندارد استفاده کردند در این مطالعه به دلیل عدم دسترسی به این سل لاین از روش کلونینگ استفاده شد. رسم منحنی استاندارد با پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *Tax-1* نشان داد که این روش با شیب خط ۳/۳ و ۰/۹۹ = R^2 قابل مقایسه با سل لاین MT2 جهت رسم منحنی استاندارد در Real Time PCR می‌باشد و نتایج آن مشابه نتایج لی و همکارانش بود. هم چنین دمای ذوب در آزمایش با پلاسمید نوترکیب ۸۹ درجه سانتی‌گراد یعنی نزدیک با دمای ذوب سل لاین MT2 یعنی ۸۸ درجه سانتی‌گراد بود. دامنه پرووایرال در این مطالعه (۱۰^۶ copy/μL - ۱۰^۱ copy/μL) ذره ویروسی بود.

نتیجه‌گیری

این آزمایش دارای دامنه مناسبی جهت تعیین پرووایرال لود از ۱۰^۶ copy/μL تا ۱۰^۱ (حد پایین تر و بالاتر تشخیصی) در هر واکنش پرووایرال لود HTLV-I بود و می‌تواند جهت بررسی رابطه بین بار پرو ویروس و بیماری‌زایی مورد 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, Bidkhorri 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 of multiplex 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.

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

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

²Institute 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