



In Silico Synthesis of HSV-2 Positive Control Using Polymerase Cycling Assembly

Zahra Sharif Zandieh¹, Shahram Samiee¹ , Kamran Mousavi Hosseini² , Zohreh Sharifi²

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

²Biological Products and Blood Safety Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran



Received: 2025/02/16
Accepted: 2025/04/30

<https://doi.org/10.18502/avr.v34i2.18052>

Citation:

Sharif Zandieh Z, Samiee Sh, Mousavi Hosseini K, Sharifi Z. In Silico Synthesis of HSV-2 Positive Control Using Polymerase Cycling Assembly. J Iran Blood Transfuse. 2025; 22 (2) :

Correspondence: Samiee SH., Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran.
Tel: (+9821); 82052206
E-mail: s.samiee@tmi.ac.ir

Correspondence: Mousavi Hosseini K., 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); 82052160
E-mail: ka.mousavi@tmi.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objectives

The use of positive controls in Real-Time PCR experiments is crucial for ensuring assay accuracy and reliability. Traditionally, such controls are derived from clinical resources. However, in situations where access to biological samples is limited, Polymerase Cycle Assembly (PCA) provides a reliable alternative for creating positive controls. The aim of this study was to evaluate the efficiency of the enzymatic method for producing genomic DNA fragments suitable for molecular biology applications. To the best of our knowledge, while PCA has been primarily employed for assembling sequences, its utility in constructing HSV-2 positive controls has not yet been investigated.

Materials and Methods

In this experimental study, the first step involved designing overlapping DNA fragments targeting the US6 region of the HSV-2 genome, a unique and well-characterized sequence selected as a suitable target. The selection of the US6 region was based on a literature review analysis. The overlapping fragments were evaluated for secondary structures and thermodynamic parameters using AlleleID software. Primer design for the US6 region was performed using MEGA version 11, ensuring specificity to the HSV-2 genome. The evaluation of the genome HSV-2 with the SnapGene software has been carried out. A comprehensive examination of the primers and their products from the secondary structure was conducted using MFold. This software analyses the sequence intended for primer design in terms of its secondary structure.

Results

Alignment analysis revealed a high degree of sequence similarity between HSV-1 and HSV-2. Therefore, primers and overlapping fragments were designed to target a region exhibiting the greatest natural variation. The results demonstrated that the in silico positive controls were comparable to natural controls, and the specificity of designed primers was confirmed. Using SnapGene software, the size of reproduced DNA segment was estimated to be approximately 70 base pairs, providing a suitable template for future studies.

Conclusions

The results demonstrate that PCA is an effective and highly reliable method for synthesizing positive controls for molecular diagnostics. Targeting the HSV-2 US6 region ensured specificity and structural integrity of the synthetic fragment.

Key words: oligonucleotides, Real-Time Polymerase Chain Reaction, HSV-2



Copyright © 2025 Journal of Iranian Blood Transfusion, Published by Blood Transfusion Research Center.
This work is licensed under a Creative Common Attribution-Non Commercial 4.0 International license.



سنتر این سیلیکو کنترل مثبت HSV-2 با استفاده از روش Polymerase Cycling Assembly

زهرا شریف زندیه^۱، شهرام سمیعی^۲، کامران موسوی حسینی^۳، زهره شریفی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
۲- کارشناس ارشد بیوشیمی - مربی مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
۳- PhD شیمی دارویی - استاد مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
۴- PhD ویروس‌شناسی - استاد مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

چکیده

سابقه و هدف

استفاده از کنترل مثبت در آزمایش‌های Real-Time PCR برای اطمینان از صحت آزمایش ضروری است که این کنترل‌ها در حال حاضر عمدتاً از منابع بالینی تهیه می‌شوند. زمانی که دسترسی به نمونه‌های مثبت بیولوژیک فراهم نباشد استفاده از روش PCA یا Polymerase Cycle Assembly برای ساخت کنترل مثبت، راهگشا خواهد بود. هدف از این پژوهش تعیین کارایی روش سنتر آنزیمی برای تولید قطعات DNA ژنومیک جهت کاربردهای بیولوژی مولکولی بود. تاکنون مطالعه‌ای پیرامون بررسی کارایی روش PCA به منظور تولید کنترل مثبت HSV-2 انجام نگرفته است و این روش عمدتاً برای مونتاژ توالی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

اولین قدم در این مطالعه تجربی، طراحی قطعات هم‌پوشان بود. ناحیه‌ای در ژنوم HSV-2 که برای آن این قطعات طراحی شدند، ناحیه‌ای منحصر به فرد به نام US6 بود. این ناحیه از طریق یک مطالعه گذشته‌نگر انتخاب شد. سپس ساختارهای ثانویه و پارامترهای ترمودینامیکی قطعات هم‌پوشان با نرم‌افزار AlleleID بررسی شد. با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه ۱۱، طراحی آغازگرها برای ناحیه‌ای منحصر به فرد در ژن US6 در ژنوم HSV-2 صورت گرفت. ژنوم HSV-2 با نرم‌افزار SnapGene مورد بررسی قرار گرفت. بررسی تکمیلی خود آغازگرها و محصول آنها از ساختار ثانویه با MFold صورت گرفت. این نرم‌افزار، توالی که قرار است برای آغازگر طراحی شود از نظر ساختار ثانویه بررسی می‌کند.

یافته‌ها

با توجه به درجه بالای شباهت توالی‌های HSV-1 و HSV-2 در بررسی‌های هم‌ردیفی، با سخت‌گیری شدید برای نواحی با بیشترین تفاوت طبیعی در محل ژن US6، آغازگر و قطعات هم‌پوشان طراحی شد. نتایج بلاست برای محصول PCR در محیط *in silico* و حصول بالاترین امتیاز برای HSV-2 اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده را تایید کرد. توسط نرم‌افزار SnapGene، اندازه قطعه تکثیر یافته در این مطالعه تخمین زده شد که برای مطالعه‌های بعدی ۷۰ جفت باز باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصله نشان داد روش سنتتیک می‌تواند کیفیت مناسبی برای ساخت کنترل مثبت داشته باشد و در حقیقت در محیط *in silico* توالی‌های طراحی شده به عنوان کنترل مثبت HSV-2 از منظر محتوای توالی مشابه با توالی‌های طبیعی این ویروس بودند که این مهم نشان می‌دهد نتایج روش PCA معادل کاربرد کنترل بالینی مثبت است.

کلمات کلیدی: الیگونیوکلئوتیدها، Real-Time PCR، هرپس ویروس ۲



تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۰

doi: <https://doi.org/10.18502/avr.v34i2.18052>

Citation:

Sharif Zandieh Z, Samiee Sh, Mousavi Hosseini K, Sharifi Z. In Silico Synthesis of HSV-2 Positive Control Using Polymerase Cycling Assembly. J Iran Blood Transfuse. 2025; 22 (2) :

نویسنده مسئول:

شهرام سمیعی. مربی مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

E-mail:

s.samiee@tmi.ac.ir

نویسنده مسئول:

کامران موسوی حسینی. استاد مرکز تحقیقات فرآورده‌های بیولوژیک و سلامت خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

E-mail: ka.mousavi@tmi.ac.ir

کد اخلاق:

IR.TMI.REC.1402.011

مقدمه

ساخت DNA سنتتیک که به طور عام به آن "سنتز ژن" اطلاق می‌شود، به فرآیند سنتز توالی‌هایی از DNA به طول ۲۵۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز از اولیگونوکلوئوتیدهای تک رشته‌ای DNA سنتتیک اشاره دارد. این اولیگونوکلوئوتیدها عمدتاً با استفاده از روش‌های شیمیایی فسفرآمیدیت تولید می‌شوند و سپس با استفاده از روش‌های مختلفی به ساختارهای بزرگ تر مونتاژ می‌گردند (۱).

در میان روش‌های موجود برای سنتز ژن، روش "Polymerase Cycle Assembly" به عنوان یک نوآوری برجسته شاخته می‌شود که می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های سنتی باشد. روش‌های قدیمی تر نظیر سنتز شیمیایی با محدودیت‌هایی در زمینه تولید کنترل مثبت مواجه هستند؛ به ویژه زمانی که طول قطعه مورد نظر بیشتر از ۳۰۰ نوکلئوتید باشد، کارایی این روش‌ها کاهش می‌یابد. علاوه بر این، وابستگی به حلال‌های آلی در این روش‌ها می‌تواند تأثیرات منفی بر محیط زیست داشته باشد. برای غلبه بر این محدودیت‌ها و ساخت DNA با همان کارایی که در خوانش DNA وجود دارد، تکنولوژی‌های جایگزین توسعه یافته‌اند و شامل مونتاژ مولکولی و روش‌های کلونینگ، روش سنتز آنزیمی مستقل از الگو، میکروآرایه و تکثیر حلقه چرخان توسعه یافته می‌باشند (۲). به طور کلی، پیشرفت‌های اخیر در زمینه سنتز DNA سنتتیک، به ویژه با ظهور روش‌های نوین مانند Polymerase Cycle Assembly، نه تنها کارایی فرآیندها را افزایش داده بلکه به حفظ محیط زیست نیز کمک می‌کند.

به علت پتانسیل بالای کاربردهای سنتز اولیگونوکلوئوتیدها در مقیاس وسیع، پیشرفت‌های قابل توجهی در علوم تجربی، به ویژه در زمینه‌های زیست‌شناسی سنتتیک، مهندسی پروتئین، مهندسی ژنوم و مهندسی متابولیک حاصل شده است (۳). با توجه به اندازه کوچک ویروس‌ها و نقش حیاتی آن‌ها در پیشرفت سلامت و بیوتکنولوژی، پیشرفت‌های چشمگیری در سنتز ژنوم‌های ویروسی مشاهده شده است (۴).

ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۲ (HSV-2) یکی از عفونت‌های منتقله از راه رابطه جنسی است که حدود ۴۹۱ میلیون نفر (۱۳٪) از افراد بین ۱۵ تا ۴۹ سال در سراسر جهان به آن مبتلا هستند (۵). گزارش‌های متعددی نشان می‌دهند که حضور DNA مرتبط با HSV در خون ممکن

است رخ دهد؛ بنابراین، احتمال انتقال HSV از طریق محصولات خونی وجود دارد. با این حال، این پدیده محدود به عفونت‌های اولیه است و در عفونت‌های راجعه مشاهده نمی‌شود. از این رو، افرادی که دچار عفونت اولیه هستند باید اهدای خون را به تعویق بیندازد (۶).

Real Time PCR یکی از روش‌های اصلی برای تشخیص این عفونت و از پرکاربردترین روش‌ها برای اندازه‌گیری بیان ژن است، زیرا دامن‌های پویا و حساسیت مناسبی دارد و می‌تواند به طور اختصاصی برای هر توالی عمل کند (۷-۹). کنترل‌های مثبت در PCR به عنوان یک اقدام تأییدی کیفی به کار می‌روند تا اطمینان حاصل شود که شرایط واکنش (مواد و وضعیت چرخه‌ها) به درستی عمل می‌کنند و نتایج منفی تنها به دلیل فقدان DNA هدف در نمونه‌های آزمایش است (۱۰). تولید کنترل‌های سنتتیک با استفاده از روش سنتز آنزیمی نیاز به کلونینگ یا تجهیزات خاص فراتر از وسایل آزمایشگاه‌های تشخیص مولکولی ندارد. این روش احتمال آلودگی یا گزارش اشتباه واکنش‌های مثبت کاذب را به علت آلودگی با مواد کنترل مثبت کاهش می‌دهد (۱۱). کنترل‌های سنتتیک تولید شده با این روش در همه آزمایش‌های تشخیص مولکولی و صرف نظر از این که ما ارگانیزم را داریم یا خیر به کار گرفته می‌شوند. از مزایای این روش می‌توان سهولت، اختصاصیت و کارایی بالای ۱۱ را متذکر شد اما در زمینه ساخت کنترل مثبت HSV-2 به طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است. با ذکر محدودیت در روش‌های موجود، این پژوهش منجر به دقت تشخیصی بهتر و اعتبار در شناسایی HSV-2 شد. هدف ما از این پژوهش، اطمینان از دقت و قابل اعتماد بودن نتایج کنترل‌های مثبت سنتز شده به روش آنزیمی در شناسایی HSV-2 نسبت به کنترل‌های بالینی بود که در حال حاضر برای این ویروس موجود است. روش آنزیمی شامل ساخت قطعات DNA HSV-2 دارای هم‌پوشانی و مشابه با توالی DNA ویروسی است. برای سنتز آنزیمی قطعه DNA نیاز به مطالعه‌های *in silico* است بدین صورت که با مقایسه ژنوم ویروس HSV-1 و HSV-2، نقاط ثلث ژنوم ویروس HSV-2 جهت تعیین مکان سنتز ژن تعیین شود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش یک مطالعه تجربی بود.

در این پروژه استفاده از اطلاعات فردی انسانی یا استفاده

از حیوان آزمایشگاهی وجود نداشت.

یافته و موقعیت آن در ژل ۲٪ تخمین زده شد.

نهایتاً محصول in silico PCR مورد جست و جوی بلاست برای اطمینان از اختصاصیت برای HSV-2 قرار گرفت. این عمل مکمل بلاست آغازگر است که در محیط SnapGene انجام گرفت؛ بدین صورت که با وارد کردن توالی آغازگر و انتخاب گزینه tools و اجرای بلاست برای آغازگرهای انتخاب شده، از اتصال اختصاصی آغازگر به ارگانیسم هدف اطمینان حاصل شد.

برای محصول in silico PCR نیز تمام نتایج گزارش شده مربوط به HSV-2 بودند. حتی زمانی که ارگانیسم HSV-1 در هم ردیفی NCBI انتخاب شد، هیچ نتیجه‌ای برای in silico PCR گزارش نشد. توالی آغازگرها در جدول قبل مشاهده هستند (جدول ۱). ترادف آغازگرهای HSV-2 نیز با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه ۱۱ و الگوریتم‌های پایه نسبت به ژنوم ویروس HSV-1 و HSV-2 مورد بررسی multiple sequence alignment قرار گرفت.

بررسی تکمیلی ساختارهای ثانویه با نرم‌افزار MFold:

خود آغازگرها و محصول آن‌ها از نظر ساختار ثانویه با MFold چک شدند. MFold یک ابزار تحت وب است که ساختار ثانویه توالی‌های اسید نوکلئیک مانند DNA یا RNA را بر اساس ویژگی‌های ترمودینامیکی پیش‌بینی می‌کند. در حقیقت، نرم‌افزار MFold توالی سکansı را که قرار است برای آن آغازگر طراحی شود از نظر وجود ساختارهای ثانویه چک می‌کند.

بدین صورت که انواع پیچ و تاب‌های توالی را در فایل‌های مختلف ارائه می‌دهد (یک توالی با حالت‌های مختلف پیچ خوردگی). زمانی که پیچ خوردگی به ویژه در نواحی GC هدف زیاد باشد پیشنهاد می‌شود که برای PCR از بتائین استفاده شود. بتائین میزان تکثیر را در چنین نواحی بالا می‌برد.

طراحی آغازگر با نرم‌افزار AlleleID:

فرآیند انتخاب ناحیه مناسب برای تفکیک سویه‌های هرپس عمدتاً به دلیل درجه شباهت توالی‌ها در خانواده هرپس ویریده دشوار بود. استراتژی ما شامل شناسایی توالی‌های حفاظت شده‌ای بود که نه تنها تفاوت‌ها را میان تایپ‌های هرپس ویروس نشان دهند بلکه این ویروس را از دیگر ویروس‌های هم خانواده و سایر DNA ویروس‌ها تمیز دهد. در این ارتباط نخست با یک مطالعه گذشته‌نگر به انتخاب ناحیه US6 رسیدیم.

اولین مرحله در این پژوهش، طراحی آغازگر برای ناحیه‌ای منحصر به فرد در ژن US6 در ژنوم HSV-2 بود. این تصمیم با استفاده از نرم‌افزار MEGA نسخه ۱۱ صورت گرفت و با آن حداقل دو توالی مجزا از HSV-2 و HSV-1 که از NCBI گرفته شده بودند، مورد هم ردیفی قرار گرفتند. پس از وارد کردن توالی‌های DNA در نرم‌افزار AlleleID نسخه ۷ با توجه به الگوریتم‌های پایه نرم‌افزار، آغازگرهای متعدد و پروب مناسب پیشنهاد شد. با این حال، تصمیم ما به کارگیری آغازگرها و پروب طراحی شده به صورت دستی به جای استفاده از پیشنهاد‌های نرم‌افزار مربوطه بود. از این نرم‌افزار برای بررسی ساختارهای ثانویه از جمله ساختارهای سنجاق سر، self-dimer و cross dimer با توجه به پارامترهای ترمودینامیکی مربوطه استفاده می‌شود. با توجه به انرژی آزاد گیبس (ΔG)، میزان انجام‌پذیری و پایداری ساختارهای ثانویه تعیین می‌شود.

بررسی ژنوم HSV-2 با نرم‌افزار SnapGene:

با انتخاب آغازگر جلوبرنده و معکوس در نرم‌افزار SnapGene، اندازه قطعه تکثیر یافته در این مطالعه PCR in silico تخمین زده شد. با توجه به آغازگرها و با انتخاب simulate agarose gel در قسمت tools، اندازه قطعه تکثیر

جدول ۱: توالی آغازگرهای طراحی شده

ژن	آغازگرها	توالی آغازگر	محصول PCR (جفت باز)	درصد GC	دمای ذوب (درجه سانتی‌گراد)
US6	جلوبرنده	CGCCAAATACGCCTTAGCA	۷۰	۵۳٪	۵۶
	معکوس	AAGGTT CTT CCC GCG AAA		۵۰٪	۵۷

طراحی قطعات هم‌پوشان برای کنترل مثبت HSV-2:

در طراحی قطعات هم‌پوشان ابتدا باید به محل جفت آغازگرهای جلوبرنده و معکوس توجه کرد. محل قطعات دارای هم‌پوشانی باید در مجاورت این دو باشد. طول این قطعات حدود ۵۰ نوکلئوتید و دمای ذوب این قطعات در محل هم‌پوشانی بهتر است حدود ۶۶ درجه سانتی‌گراد باشد. در حدود ۴-۵ نوکلئوتید سر 3' هر یک از قطعات از نظر درصد بازهای پورینی و پیریمیدینی می‌بایستی متناسب باشند.

یافته‌ها

طراحی آغازگر با نرم‌افزار AlleleID:

همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، امتیاز آغازگرهای پیشنهادی در نرم‌افزار AlleleID خوب تلقی شد. تنها در رشته antisense ساختار ثانویه self-dimer

مشاهده شد و این ساختار در رشته sense وجود نداشت (شکل ۱). از آن جایی که مقدار انرژی لازم برای شکستن این ساختارها بیش از ۵ Kcal/mol است (ΔG)، از منظر پایداری، تشکیل این ساختار ثانویه قابل قبول است. انرژی آزاد گیبس (ΔG)، انرژی لازم برای شکستن ساختار ثانویه می‌باشد و مقادیر بسیار منفی آن نشان‌دهنده تمایل بیشتر آغازگرها برای اتصال به یکدیگر است و چون این انرژی برای ساختار cross dimer در شکل ۲، از ۶kcal/mol- بیشتر است، نشان‌دهنده قابل قبول بودن این پارامتر می‌باشد (شکل ۲).

با انتخاب آغازگر جلوبرنده و معکوس در نرم‌افزار in SnapGene، اندازه قطعه تکثیر یافته در این مطالعه silico PCR تخمین زده شد که میزان ۷۰ جفت باز بود (شکل ۳). توالی قطعات هم‌پوشان با توجه به قطعه جلوبرنده و قطعه معکوس در جدول ۳ آمده است.

جدول ۲: بررسی ویژگی‌های آغازگرهای پیشنهادی نرم‌افزار AlleleID

موقعیت	امتیاز	توالی	موقعیت	طول (جفت باز)	Tm (درجه سانتی‌گراد)	GC (%)	Hairpin ΔG (kcal/mol)	Self dimer ΔG (kcal/mol)
رشته sense	۶۰/۳	CCGTACCACCAGCACC	۸۱۴	۱۸	۶۹/۱	۶۶/۷	-۱.۲	-۲.۱
رشته antisense	۶۶	TCTGCGAAGACACCGT	۹۴۳	۱۸	۶۸/۳	۶۱/۱	-۱.۲	-۱.۲
محصول PCR	۶۶/۱			۱۳۰	۸۷/۱			

Accession Number: *000001

Self Dimer | Hairpin | Cross Dimer | Runs | Repeats

#	Sense Self Dimer	ΔG (kcal/mol)
	Not Found.	

#	Anti-sense Self Dimer	ΔG (kcal/mol)
1.	5' AAGGTTCTTCCGCGAAAT 3' 3' TAAAGCGCCCTTCTTGGAA 5' 5' AAGGTTCTTCCGCGAAAT 3' 	-5.3
2.	3' TAAAGCGCCCTTCTTGGAA 5' 5' AAGGTTCTTCCGCGAAAT 3' 	-0.6
3.	5' AAGGTTCTTCCGCGAAAT 3' 3' TAAAGCGCCCTTCTTGGAA 5'	-0.6 (3' Dimer)

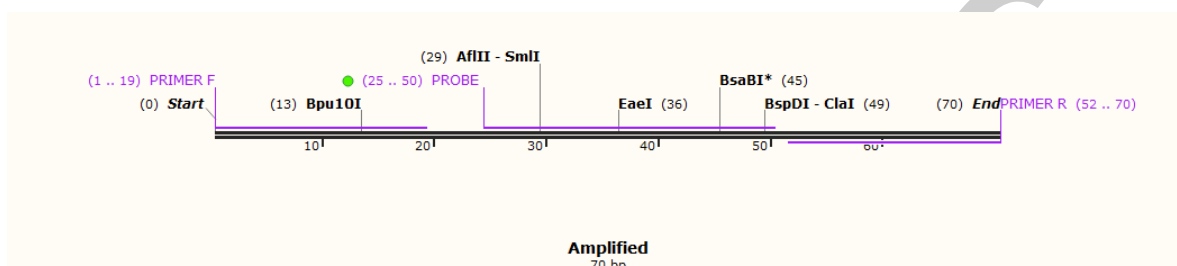
شکل ۱: self-dimer در آغازگرهای دو رشته

Accession Number: *000001

Self Dimer | Hairpin | Cross Dimer | Runs | Repeats

#	Cross Dimer	ΔG (kcal/mol)
5' CGCCAAATACGCCTTAGCA 3'	3' TAAAGCGCCCTTCTTGGAA 5'	-2.9
5' CGCCAAATACGCCTTAGCA 3'	3' TAAAGCGCCCTTCTTGGAA 5'	-2.9

شکل ۲: cross-dimer در آغازگرهای دو رشته



شکل ۳: in silico PCR

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Job Title: Nucleotide Sequence

RID: 66C0X2J9013 Search expires on 06-09 00:06 am Download All

Program: BLASTN Citation

Database: nt See details

Query ID: lcl|Query_6489475

Description: None

Molecule type: dna

Query Length: 70

Other reports: Distance tree of results MSA viewer

Filter Results

Organism: only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

+ Add organism

Percent Identity: to E value: to Query Coverage: to

Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Human alphaherpesvirus 2 strain MS_complete genome	Human alphaherpesvirus 2	130	130	100%	3e-26	100.00%	155975	MK855052.1
Human alphaherpesvirus 2 isolate HJ12_complete genome	Human alphaherpesvirus 2	130	130	100%	3e-26	100.00%	156293	MN187895.1
Synthetic construct clone BAC.1-5	synthetic construct	130	130	100%	3e-26	100.00%	140006	MH796784.1
Synthetic construct clone BAC.10-6	synthetic construct	130	130	100%	3e-26	100.00%	139900	MH796783.1
Human alphaherpesvirus 2 strain 2006-15095_partial genome	Human alphaherpesvirus 2	130	130	100%	3e-26	100.00%	153590	MH899846.1
Human alphaherpesvirus 2 strain 2014-8176_partial genome	Human alphaherpesvirus 2	130	130	100%	3e-26	100.00%	155801	MH790671.1
Human alphaherpesvirus 2 strain 1996-45091_partial genome	Human alphaherpesvirus 2	130	130	100%	3e-26	100.00%	154091	MH790670.1
Human alphaherpesvirus 2 strain 2009-33886_partial genome	Human alphaherpesvirus 2	130	130	100%	3e-26	100.00%	153897	MH790669.1
Human alphaherpesvirus 2 strain 2007-15346_partial genome	Human alphaherpesvirus 2	130	130	100%	3e-26	100.00%	152440	MH790668.1

شکل ۴: نتیجه بلاست PCR product

بررسی‌های مدل ارائه شده تغییرات بسیار کمی را از خود نشان می‌داد و این مورد انتخاب را مشکل می‌نمود؛ به طوری که در نتایج قابل مشاهده است، میزان تغییرات از درصد کمی بین دو گونه ویروس برخوردار بود. بر این اساس هنگام طراحی آغازگر و پروب‌های موجود، بیشتر توجه به تغییرات در سمت 3' آغازگرها و پروب معطوف گردید. این مورد اختصاصیت و تمایز بین دو گونه را به بالاترین حد خود رسانید به طوری که هنگامی که ترادف‌ها مورد تجزیه و تحلیل BLAST قرار می‌گرفتند نتیجه نوع alignment در مورد HSV-2 با بالاترین امتیاز کاملاً مشخص بود (شکل ۶). همان‌طور که در نتیجه بلاست قابل مشاهده است، آغازگر طراحی شده صرفاً HSV-2 را شناسایی کرد و طبق این نتیجه، آغازگر جایگاه اتصال غیر اختصاصی در ارگانیسم‌های دیگر نداشت.

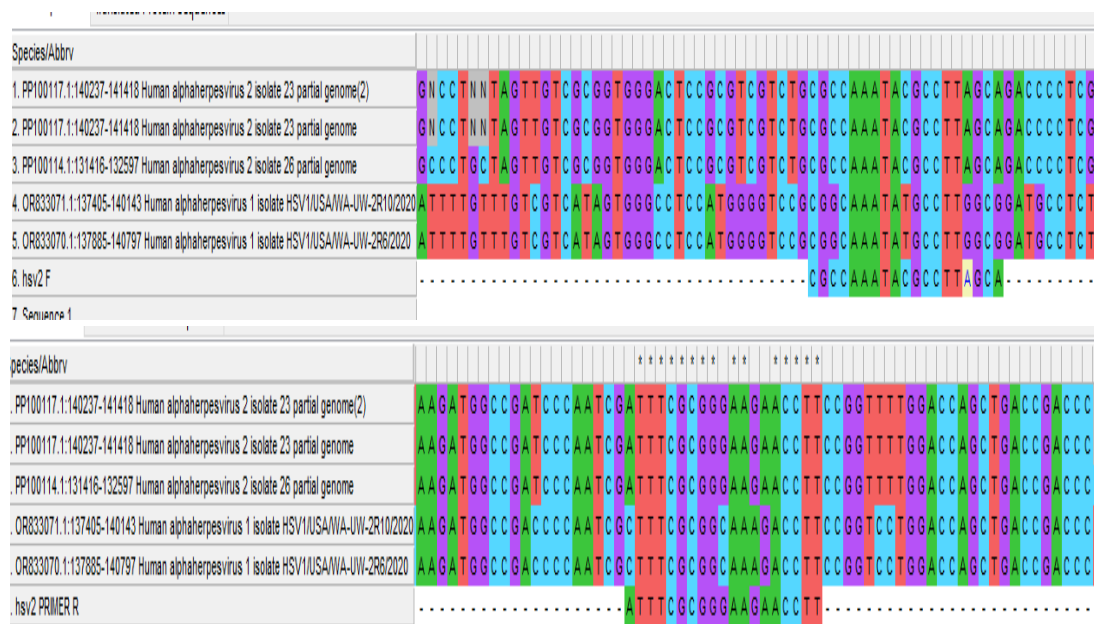
بررسی تکمیلی ساختارهای ثانویه با *MFold*:

همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، تعداد 3GC همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، تعداد 3GC loop در محصول PCR پیش‌بینی می‌شود که برای جلوگیری از تشکیل آن‌ها در شرایط آزمایشگاه پیشنهاد شد که از بتائین استفاده شود.

قدم بعدی در این ارتباط، تجزیه و تحلیل *in silico* آغازگرها و پروب در رابطه با ترادف متناظر می‌باشد. در این رابطه از نرم‌افزار Snap gene استفاده شد. علاوه بر تعیین موقعیت، تجزیه و تحلیل PCR حاصله در محیط *in silico* متناظر با واقعیت تعیین گردید. طول قطعات، محاسبه شده و تجزیه و تحلیل الکتروفورز حاصل از PCR مشخص شد. علاوه بر آن با استفاده از قابلیت این نرم‌افزار به انجام بلاست قطعه مورد نظر پرداخته شد.

نتیجه بلاست برای محصول PCR در شکل مشاهده می‌شود (شکل ۴). همان‌طور که قابل رؤیت است، این نتایج همگی مربوط به HSV-2 بوده و محصول غیر اختصاصی با این آغازگرها شناسایی نمی‌شود.

بر مبنای اطلاعات موجود در Gene Bank، نواحی ثبت شده از سویه‌های مختلف HSV-1 و HSV-2 انتخاب و مورد تجزیه و تحلیل multiple sequence alignment توسط نرم‌افزار Mega نسخه ۱۱ و سرور ClustalW قرار داده شد. در شکل ۵ نتیجه هم‌ردیفی در MEGA میان آغازگرهای جلوبرنده و معکوس با ژنوم HSV-1 و HSV-2 قابل رؤیت است. همان‌طور که قابل بررسی است، در جایگاه طراحی آغازگر، ژنوم این دو ویروس تفاوت‌های انسدکی دارند که از این مهم در طراحی آغازگر بهره گرفته شد.



شکل ۵: هم‌ردیفی میان آغازگر جلوبرنده و معکوس طراحی شده و ژنوم HSV-1 و HSV-2

[Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

1 Your search parameters were adjusted to search for a short input sequence.

Job Title Nucleotide Sequence
RID 8CKB8ZF3016 Search expires on 07-05 15:21 pm [Download All](#)
Program BLASTN [Citation](#)
Database nt [See details](#)
Query ID lclQuery_6912455
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 19
Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear ☐ exclude
 Type common name, binomial, taxid or group name
[Add organism](#)

Percent Identity to to **E value** to to **Query Coverage** to to

[Filter](#) [Reset](#)

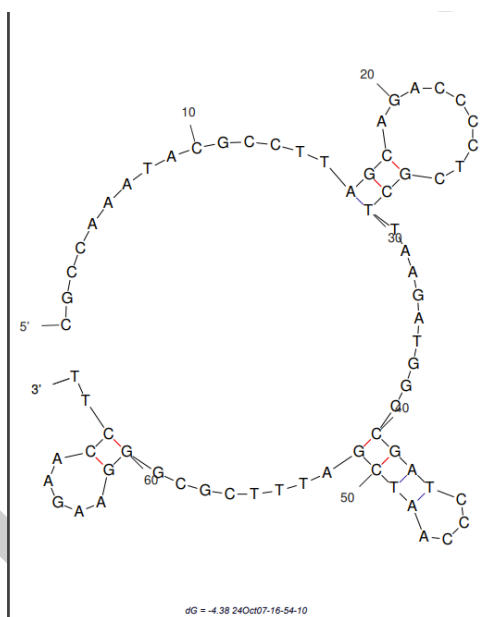
Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) [Show](#) 100

☒ select all 100 sequences selected

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Human alphaherpesvirus 2 isolate 23, partial genome	Human alphaherpesvirus 2	38.2	38.2	100%	12	100.00%	153322	PP100117.1
☒ Human alphaherpesvirus 2 isolate 27, partial genome	Human alphaherpesvirus 2	38.2	38.2	100%	12	100.00%	143259	PP100116.1
☒ Human alphaherpesvirus 2 isolate 17, partial genome	Human alphaherpesvirus 2	38.2	38.2	100%	12	100.00%	153283	PP100115.1
☒ Human alphaherpesvirus 2 isolate 26, partial genome	Human alphaherpesvirus 2	38.2	38.2	100%	12	100.00%	144553	PP100114.1
☒ Human alphaherpesvirus 2 isolate 4, partial genome	Human alphaherpesvirus 2	38.2	38.2	100%	12	100.00%	151261	PP100113.1
☒ Human alphaherpesvirus 2 isolate 5, partial genome	Human alphaherpesvirus 2	38.2	38.2	100%	12	100.00%	143140	PP100112.1
☒ Human alphaherpesvirus 2 isolate 13, partial genome	Human alphaherpesvirus 2	38.2	38.2	100%	12	100.00%	148198	PP100111.1

شکل ۶: نتیجه بلاست آغازگر تعیین شده



شکل ۷: ساختارهای ثانویه در محل طراحی آغازگر. همان طور که مشاهده می شود محل طراحی آغازگر دارای ۳ GC loop است.

جدول ۳: توالی قطعات همپوشان

عنوان	قطعه	توالی قطعه	اندازه محصول PCR (جفت باز)	درصد GC	دمای ذوب (درجه سانتی گراد)
قطعات همپوشان	قطعه جلوبرنده	CGC CAA ATA CGC CTT AGC AGA CCC CTC GCT TAA GAT GGC CGA TCC CA	۷۰	۵۷٪	۷۵
	قطعه معکوس	AAG GTT CTT CCC GCG AAA TCG ATT GGG ATC GGC CAT CTT AAG CG		۵۲٪	۷۳

بحث

هدف این مطالعه ساخت قطعات اولیگونوکلئوتیدی بود که به عنوان اجزای کلیدی سنتز ژن استفاده می‌شود. از کاربردهای سنتز قطعات اولیگونوکلئوتیدی، تولید کالیبراتورها برای واکنش‌های کمی PCR (qPCR)، ساخت عناصر ژنتیکی پایه برای مهندسی ژنتیک و بهبود ویژگی‌های مورد نظر یک آنزیم یا پروتئین و تولید RNA antisense به منظور درمان ناهنجاری‌های اسکلتی و .. می‌باشد.

با توجه به بررسی‌های *in silico*، روش PCA در تولید کنترل مثبت HSV-2 نتایج قابل قبولی به ارمغان آورد. این امر می‌تواند پایه پیشرفت در بیولوژی سنتتیک با انقلاب در تشخیص‌های مولکولی از طریق فراهم‌سازی سنتز دقیق و قابل اعتماد کنترل‌های مثبت شود. در مقاله هیوز و همکاران نقش حیاتی مونتاژ DNA سنتتیک در این پیشرفت‌ها برجسته شده است. در این مطالعه روش‌های متعددی برای سنتز DNA سنتتیک از جمله ترکیب روش‌های شیمیایی مانند روش microarray و روش آنزیمی برای اصلاح خطا بیان شده است (۱). به علاوه به روش‌های مونتاژ از جمله انواع PCA (Polymerase Chain Assembly) به عنوان پرکاربردترین روش برای ساخت قطعات بزرگ اولیگونوکلئوتیدی اشاره شده است. بر این اساس مطالعه ما کاربرد Cycle Assembly Polymerase را برای سنتز کنترل‌های مثبت HSV-2 در تجزیه و تحلیل‌های مولکولی بررسی می‌کند. یافته‌های ما نشان داد که در مطالعه‌های *in silico* روش PCA جایگزینی قدرتمند برای سنتز کنترل‌های مثبت HSV-2 است؛ به ویژه در شرایط محدود از نظر منابع که دسترسی و هزینه معقول به صرفه حیاتی هستند.

در مقاله ترمات و همکاران از روش Integrated PCA برای ساخت کنترل مثبت استفاده شد که این مطالعه دارای شرایط بهینه نظیر زمان آنیلینگ کوتاه، Thermal cycler های سریع و غلظت‌های اندک اولیگو (حدود ۵-۱۰ نانومولار) بود (۱۲). این پارامترها مونتاژ هم‌زمان و تکثیر ژن را تسهیل می‌نمایند. نقطه تلاقی این پژوهش با پژوهش ما موفقیت در طراحی اولیگو و شرایط بهینه واکنش است که برای هریک منحصر به فرد می‌باشد. تأکید مقاله ترمات بر اهمیت تنظیم غلظت اولیگو برای توالی‌های طول‌تر ژنی یا زمان به کارگیری تعداد بیشتری از قطعات اولیگو است. لذا از این روش به دلیل رقابت آغازگرها و misannealing برای ساخت قطعات ژن طول‌تر کمتر

استفاده می‌شود. با توجه به اندازه کوچک کنترل مثبت طراحی شده در پژوهش ما، چنین چالشی که در سنتز توالی‌های طول‌تر ژنی وجود دارد، در بخش آزمایشگاهی پژوهش ما دیده نخواهد شد.

در مقاله هوز و همکاران شکاف تکنولوژی برای ساخت توالی‌های طول‌تر DNA بحث می‌شود که منعکس‌کننده چالش‌های مونتاژ برای ساخت کنترل‌های دقیق است که این با کاربرد PCA به عنوان روشی نوین همراستا می‌باشد (۲). به علاوه قابلیت دسترسی نیز به طور غیر مستقیم توان روش PCA را در بیولوژی سنتتیک به منظور کاهش پیچیدگی ذکر شده تایید می‌کند. کاربرد مطالعه ما به طور خاص محدود به حوزه تشخیص ذکر شده است در حالی که در مقاله هوز این کاربردها گسترده‌تر بوده و روند روش‌های سنتز DNA و رقابت تجاری آن‌ها بیان شده است. در حقیقت مطالعه ما مثالی از یک راه حل هدفمند برای مشکلی در زمینه‌ای گسترده‌تر است.

در مقاله چن و همکاران برای شناسایی HSV-2 از جفت آغازگرهایی استفاده شد که UL52 را شناسایی می‌کردند اما در مقاله ما جفت آغازگرها برای شناسایی US6 طراحی شده بود (۱۳). ناحیه UL52 در همانندسازی این ویروس دخالت دارد و در چرخه ویروس ضروری است. آغازگرهای طراحی شده برای این ناحیه فعالیت ویروس و نشانه‌های همانندسازی را شناسایی می‌کند. در حالی که US6 گلیکوپروتئین D را کد می‌کند که نقش حیاتی در ورود ویروس به سلول‌های میزبان دارد و هدف واکنش‌ها و مداخلات درمانی است. هر جفت آغازگر با موفقیت HSV-2 را شناسایی می‌کنند اما انتخاب ناحیه هدف، حساسیت و اختصاصیت روش تشخیصی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ناحیه US6 در مکانیسم‌های گریز سیستم ایمنی به درک پاتوژنیسیته ویروس و تعاملات آن با سیستم ایمنی میزبان کمک می‌کند. به نظر می‌رسد که تفاوت‌های دو ویروس HSV-1 و HSV-2 در US6 هنگام بررسی Alignment بیشتر بوده و لذا توان افتراقی این ناحیه برای طراحی آغازگر و پروب احتمالاً بهتر است.

از محدودیت‌های این پژوهش عدم دسترسی به نرم‌افزارهای گران قیمت بیوانفورماتیکی نظیر DNASTAR Lasergene Suite می‌باشد که یک پکیج کامل برای مونتاژ توالی‌ها، هم ردیفی و تجزیه و تحلیل آن‌هاست.

پیشنهاد می‌شود این پژوهش با تمرکز بر طراحی کنترل مثبت دیگر پاتوژن‌ها از جمله non-tuberculosis

mycobacteria و حتی کنترل مثبت سرطان‌ها ادامه یابد.

انتقال خون تهران، ایران است.

نتیجه‌گیری

طبق بررسی‌های in silico کنترل‌های مثبتی که با روش PCA طراحی شدند، از منظر طول قطعه و محتوای توالی قابل مقایسه با کنترل‌های طبیعی بودند. در ساخت کنترل مثبت طول‌تر با این روش، تنظیم غلظت قطعات هم‌پوشان حائز اهمیت بود اما با توجه به اندازه کوچک کنترل مثبت در پژوهش ما، این چالش برای این اندازه از قطعات پررنگ نیست. لذا به نظر می‌رسد که در شرایطی که دسترسی به نمونه بالینی فراهم نباشد می‌توان از نمونه سنتتیک استفاده کرد.

حمایت مالی

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

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر دارای کد اخلاق IR.TMI.REC.1402.016 از کمیته اخلاق مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب

عدم تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌کنند هیچ‌گونه تعارض منافی در این مطالعه وجود نداشته است.

نقش نویسندگان

زهرا شریف زندیه: نگارش مقاله و انجام آزمایش‌ها
شهرام سمیعی: ایده مقاله و نظارت بر انجام مطالعه و نگارش مقاله
دکتر کامران موسوی حسینی: ایده مقاله و نظارت بر نگارش مقاله
زهره شریفی: ایده مقاله و نظارت بر نگارش مقاله

تشکر و قدردانی

این پژوهش با کد اخلاق IR.TMI.REC.1402.011 در کار گروه اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأیید شده است. بودجه این تحقیق توسط مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین شده است.

References:

- Hughes RA, Ellington AD. Synthetic DNA Synthesis and Assembly: Putting the Synthetic in Synthetic Biology. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017 Jan 3;9(1):a023812. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023812>
- Hoose A, Vellacott R, Storch M, Freemont PS, Ryadnov MG. Publisher Correction: DNA synthesis technologies to close the gene writing gap. Nat Rev Chem. 2023 Aug;7(8):590. <https://doi.org/10.1038/s41570-022-00456-9>
- Song LF, Deng ZH, Gong ZY, Li LL, Li BZ. Large-Scale de novo Oligonucleotide Synthesis for Whole-Genome Synthesis and Data Storage: Challenges and Opportunities. Front Bioeng Biotechnol. 2021 Jun 22;9:689797. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.689797>
- Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. Science. 2002 Aug 9;297(5583):1016-8. <https://doi.org/10.1126/science.1072266>
- Herpes: HSV1 and HSV2. <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/herpes-hsv1-and-hsv2#:~:text=In%20the%20case%20of%20HSV,is%20active%20at%20that%20time.>
- Juhl D, Mosel C, Nawroth F, Funke AM, Dadgar SM, Hagenström H, et al. Detection of herpes simplex virus DNA in plasma of patients with primary but not with recurrent infection: implications for transfusion medicine? Transfus Med. 2010 Feb;20(1):38-47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2009.00951.x>
- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques. 2005 Jul;39(1):75-85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>
- Han X, Beck K, Bürgmann H, Frey B, Stierli B, Frossard A. Synthetic oligonucleotides as quantitative PCR standards for quantifying microbial genes. Front Microbiol. 2023 Oct 24;14:1279041. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1279041>
- Kadkhodaei S, Rajabi Memari H, Abbasiliasi S, Akhavan Rezaei M, Movahedi A, Joo Shun T, et al. Multiple overlap extension PCR (MOE-PCR): an effective technical shortcut to high throughput synthetic biology. RSC Advances. 2016;6(71):66682-66694. <https://doi.org/10.1039/C6RA13172G>
- Wilson CC, Wozney KM, Smith CM. Recognizing false positives: synthetic oligonucleotide controls for environmental DNA surveillance. Methods in Ecology and Evolution. 2016;7(1):23-29. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12452>

- 11- Borst A, Box AT, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004 Apr;23(4):289-99. <https://doi.org/10.1007/s10096-004-1100-1>
- 12- TerMaat JR, Pienaar E, Whitney SE, Mamedov TG, Subramanian A. Gene synthesis by integrated polymerase chain assembly and PCR amplification using a high-speed thermocycler. *J Microbiol Methods.* 2009 Dec;79(3):295-300. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2009.09.015>
- 13- Chen Z, Zhao K, Tan B, Tong Z, He Z, Luo X, *et al.* Development of a high specificity typing method for the detection of herpes simplex virus. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Aug 17;10:955713. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.955713>