تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال چهاردهم
شهریور - مهر
۱۳۹۰
شماره ۷۳

معرفی تکنیک تکثیر بر مبنای توالی اسید نوکلئیک

An introduction to Nucleic Acid Sequence Based Amplification technology (NASBA)

لیلا مرادی حقگو / عضو مدعو دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان
دکتررضا حبیبی پور / عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان

چکیده :

پیش گفتار: نبود پاسخ های ایمنی مناسب در زمینه کمیت سنجی و حساسیت کم روش هایی مانند بلاتینگ در اندازه های کم نمونه ، تکثیر اسید نوکلئیک (DNA یا RNA) را به یکی از ابزارهای مهم پژوهشی بیولوژیست ها تبدیل کرده است. NASBA از جمله روش های تکثیر بر مبنای توالی هدف می باشد، که دارای برتری هایی نسبت به روش مرسوم تکثیری PCR می باشد.

محتوا: روی هم رفته NASBA روش تکثیری هم دما، اختصاصی برای تکثیر و شناسایی هدف های RNA بر پایه نسخه برداری است. اما برای تکثیر DNA هم قابل اجراست و تنها نیازمند واسرشته سازی اولیه پیش از انجام آن است. در این روش الگوی مورد نظر با استفاده از سه آنزیم AMV-RT, RNase H وRNA پلیمراز، دو نوع آغازگر، نوکلیوزیدهای تری فسفات و ترکیبات مناسب بافری در دو مرحله تکثیر می شود.
در مرحله اول (غیر چرخه ای) آغازگراول(انتهای '3 آن مکمل توالی هدف و '5 آن دارای توالی پروموتری T7) به توالی هدف پیوند شده، AMV-RT عمل پلیمرازی را انجام می دهد و هیبرید DNA-RNA بدست می آید. سپس آنزیم RNase H رشته RNA آن را هیدرولیزمی کند و تک رشته DNA باقی می ماند.
پس از به دست آمدن DNA تک رشته ای، آغازگر دوم (مکمل توالی سمت '5 الگو) به آن می پیوندد، و AMV-RT رشته دوم DNA را سنتز کرده و cDNA بدست می آید. آنزیم RNA پلیمراز T7 کپی های RNAیی از این cDNA را با فراوانی صدها برابر الگوی اولیه ساخته می شود. RNA جدید الگویی برای نسخه برداری معکوس در مرحله دوم (چرخه ای) است که در آن فرایندهای فوق تکرار می شوند، با این تفاوت که این بار ابتدا آغازگر دوم به الگوی RNA پیوند می شود.
تمامی مراحل این واکنش ها در دمای C°۴۱ و به مدت ۹۰ دقیقه انجام می گیرد، وفرآورده تکثیری معادل ۱۰۹ مولکول به دست می آید. شناسایی فرآورده های تکثیر یافته توسط یکی از روش های استفاده از ژل آگارز، نورترن بلاتینگ و ELOGA یا روش های جدیدتری همچون Ecl و مولکول های راهنما انجام می گیرد.
ترکیب NASBA و مولکول راهنما باعث تکثیر و شناسایی همزمان در یک ویال بسته می شود که از آن به عنوان AmpliDet RNA یاReal- time NASBA نام می برند.

تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال چهاردهم
شهریور- مهر
۱۳۹۰
شماره ۷۳

نتیجه گیری:

NASBAبه طورموفقی در شناسایی، آنالیز و کمیت سنجی mRNA و RNA های ویروسی، باکتریایی و قارچی در نمونه های گیاهی، کلینیکی وغذایی عمل کرده است. کاربردهای گسترده ای از شناسایی عوامل بیماری زا، تشخیص فعالیت های بیولوژیکی، مانند بیان ژن و زیستایی موجودات تا تشخیص SNPsدارد.

ازمیان برتری های مهم این تکنیک می توان به طراحی آغازگر از ناحیه اینترون، نیاز به مقدار نمونه کم، سهولت ، حساسیت بالا، تعداد نسخه های تکثیری فراوان، توانایی تکثیر وتشخیص سریع همزمان ، ارزیابی کمی وکیفی، نیاز به چرخه ها و زمان کمتر در مقایسه با PCR و در پی با کاهش میزان لغزش ها ونبود نیاز به وسیله مخصوص (قابل اجرا در انکوباتور، حمام آبگرم و heat block) اشاره کرد.

چالش هایی در زمینه بهینه سازی به دلیل تاثیر بازدارنده های موجود در برخی از نمونه ها، ناپایدار بودن RNA و نیاز به دستگاه های گران قیمت لیزری در برخی از روش های شناسایی از جمله کاستی عمده این روش می باشد.

کلمات کلیدی: تکثیر هم دما، لومینسانس الکتروشیمی، مولکول های راهنما، AmpliDet RNA، چند شکلی تک نوکلئوتیدی.

پیش گفتار:

نبود پاسخ های ایمنی قابل اندازه گیری و حساسیت کم روش هایی مانند بلاتینگ هنگامی که مقدار نمونه کم است، تکثیر اسید نوکلئیک را به دلیل حساسیت زیاد آن (تا یک میلیون برابر) به یکی از ابزارهای مهم پژوهشی بیولوژیست ها تبدیل کرده است[۱،۲].

در ده سال گذشته، استفاده از آزمون های تکثیری اسید نوکلئیک از حالت استفاده ی تنها در بخش پژوهش به استفاده های آزمایشگاهی کشیده شده است. استفاده از تکنیک های مولکولی در هنگامی که عوامل بیماری زا قابل کشت نیست (ویروس هایی مانند هپاتیت)یا کشت آن ها مشکل است(مایکو باکتریوم) و یا به دلایل امنیتی نمی توان آن ها را کشت داد (ویروس سارس) بسیارمناسب می باشد [۷].

تکثیر اسیدهای نوکلئیک را می توان بر پایه تکثیر توالی هدف[۱] سیگنال (bDNA[۲], SMART[۳], RAM[۴]) و شناساگر[۵] تقسیم بندی کرد[۷].

تکثیر برپایه توالی هدف (DNA, RNA)به دو دسته مبتنی بر[۶] PCR (نیازمند چرخه حرارتی) و غیر مبتنی بر PCR (هم دما[۷]) تقسیم می شود [۹].

تکثیر بر پایه PCR قدیمی ترین و رایج ترین روش استاندارد تکثیر بر مبنای توالی هدف است، بهر روی ، تازگی ها چندین روش تازه ی تکثیر توالی هدف گزارش شده است، که هنوز در گام های نخست خود قرار دارند و هر یک دارای برتری هایی در مقایسه با PCR می باشد. برای نمونه : روش های TAS, 3SR, Q beta یا هم دما بودن واکنش های 3SR و NASBA[۸] [۱۵].

چرا تکثیر RNA؟

با تکثیر RNA شمار زیادی از مولکول ها می توانند به عنوان الگو عمل کنند. ضمن اینکه حتی در سلول هایی با بیان کم، تعداد RNA های موجود بیش ازDNA است.

از معایب آن وجود موجودات غیر زنده است که باعث بوجود آمدن نتایج مثبت کاذب[۹] می شوند، اما از آنجایی که پایداری RNA در مقایسه با DNA به نسبت کمتر است پس شناسایی RNA شاخص مناسبی در زنده بودن موجود است [۲].

از خصوصیات رتروویروس ها می توان به انتقال اطلاعات ژنتیکی از RNA، با نسخه برداری معکوس به DNA و سپس بازگشت به RNA اشاره کرد، از این سیستم در طراحی تکنیک های تکثیری RNA کمک گرفته شده است [۴].

در تکثیر RNA به روش PCR نیاز به مرحله نسخه برداری معکوس و تبدیل RNA به توالی DNA است، که می تواند به عنوان الگویی برای تکثیر در RT-PCRبه کار رود. NASBA روش دیگری برای تکثیر RNA می باشد، اگر چه این روش به گونه ا ی ویژه برای تشخیص و تکثیر انواع RNA ها به کار برده می شود، ولی اجرای این روش برای DNA هم قابل اجراست.

1.Target amplification
2.Branched DNA
3. Switching Mechanism At 5› end of RNA
4. Ramification-extension Amplification Method
5.Probe amplification
6.Polymerase chain reaction (PCR)
7.Isothermal
8.Nucleic acid sequence based-amplification (NASBA)
9.False- positive

برای تکثیر DNA نیز فرایند تکثیری مشابه تکثیرRNA است، با این تفاوت که پیش از اضافه کردن آنزیم موردنیاز برای واکنش باید واسرشته سازی[1] اولیه (۱۰۰درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه) صورت گیرد [۶]. توان تکثیری NASBA قابل مقایسه و حتی گاهی بالاتر از PCR گزارش شده است [۱۵].

معرفی تکنیک (NASBA)
Nucleic Acid Sequence Based-Amplification

NASBA روشی است که دارای فرایند های اصلی آزادسازی، استخراج اسیدنوکلئیک، تکثیر و شناسایی فرآورده های تکثیر شده می باشد [۷]. برای استخراج DNA یا RNA مورد نیاز می توان از روش بوم و همکاران (۱۹۹۱) استفاده کرد.

در این روش سلول ها با بافر لیزکننده پاره شده، RNAو DNAآن آزاد شده و تحت شرایط نمکی با غلظت بالا به ذرات سیلیکای موجود ،که به عنوان فاز جامد عمل می کنند، می چسبند (اگر بخواهیم تنها DNA را استخراج کنیم RNase استفاده می کنیم و اگر بخواهیم RNA استخراج کنیم از DNase استفاده می کنیم).

برای حذف پروتئین ها و بازدارنده ها ذرات سیلیکا دو بار توسط بافر شستشو شسته شده، سپس دو بار با الکل ۷۰٪ و یکبـــار با استون شسته می شود . سپس سانتریفوژ می گردد. رسوب[2]سیلیکای حاصل در ۵۶° C خشک شده و در مرحله پس با استفاده از ستون کروماتوگرافی با کمک بافر مناسب DNA یا RNA ها خارج[3] می شوند.

NASBA از جمله روش های تکثیر بر مبنای توالی هدف می باشد، که دارای برتری هایی نسبت به روش مرسوم تکثیری PCR می باشد.
NASBAبه طور موفقی در شناسایی، آنالیز و کمیت سنجی mRNA و RNA های ویروسی، باکتریایی و قارچی در نمونه های گیاهی، کلینیکی و غذایی عمل کرده است.

با استفاده از این روش جداسازی می توان از حجم های بسیار کم نمونه DNA(2ml -10µl)یا RNA استخراج کرد [۷، ۱۲، ۱۳].

NASBA روشی هم دما (ایزوترمال)، در سطح نسخه برداری[4]برای تکثیر RNA با استفاده از سه آنزیم[5]AMV- RT ,RNase H وRNA پلیـــمراز، دو نوع آغازگر[6]، نوکلئـــوزیدهای تری فسفات و ترکیب مناسب بافری می باشد که دارای دو مرحله غیر چرخه ای و چرخه ای است. این روش برای اولین بار در سال ۱۹۹۱ توسط کایوت و همکاران برای شناسایی نمونه های آلوده به ویروس HIV-1به کار رفت [۲].

حدود ۲۰ باز انتهای 3' آغازگر شماره یک (P1) مکمل توالی هدف بوده و سمت 5' این آغازگر دارای توالی پروموتری است که توسط RNAپلیمراز T7 شناسایی می شود.

آغازگر شماره دو (P2) مشتق شده از توالی عکس 5' الگو است، اگر از سیستم[7] Ecl برای شناسایی استفاده شود، P2 دارای یک انتهای طویل شامل توالی مکمل Ecl می باشد.

در مرحله اول (غیر چرخه ای) آغازگر الیگونوکلئوتیدی (P1) به توالی هدف پیوند شده، AMV-RT عمل پلیمرازی را انجام و cDNAیی بدست می آید، که با RNA هیبرید است (DNA-RNA).

آنزیم RNase H رشته RNA هیبرید (DNA-RNA) را هیدرولیز می کند وتک رشته DNA باقی می ماند. سپس آغازگر دوم(P2) به تک رشته cDNA پیوند می شود واین امکان را فراهم می آورد،که فعالیت DNA پلی مرازی -AMV RT دوباره شروع شود. فعالیت آنزیم AMV-RT منجر به تولید cDNA دو رشته ای ساخته شده از RNA الگوی اولیه می شود.

بااستفاده‌از قدرت زیاد بیان پروموتر RNA پلیمراز T7 مقدار بسیار زیادی ازنسخه های RNA تک‌رشته‌ای آنتی سنس (۱۰-۱۰۰۰نسخه) متناظر با RNA اولیه ساخته می شود. این نسخه های RNA آنتی سنس جدید بعنوان الگویی برای نسخه بردای معکوس در مرحله دوم به کار می روند.

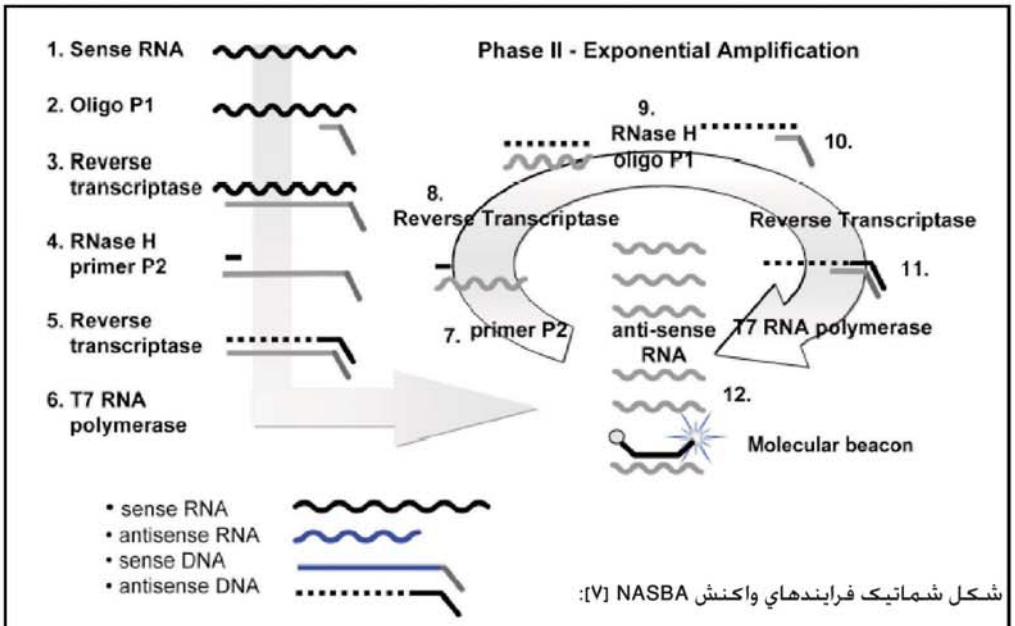
در مرحله دوم (مرحله چرخه ای) دوباره فرایندهای فوق تکرار می شوند با این تفاوت که این بار ابتدا آغازگر دوم(P2) به الگوی RNA پیوند شده و با فعالیت آنزیم پلیمرازی AMV-RT بسط می یابد، بنابراین بازهم هیبریدDNA-RNA همانند پیش بوجود می آید که رشته RNA آن توسط آنزیم RNase H هیدرولیز می شود.

با تک رشته ای شدن DNA آغازگر اول (P1) به آن پیوند شده و آنزیم AMV-RT آن را بسط می دهد تا cDNA دو رشته ای به دست آید. در این مرحله فعالیت نسخه برداری آنزیم RNA پلیمراز T7 باعث ساخته شدن رشته های RNA می شود و این فرایند به طور چرخه ای ادامه می یابد.

1. Denaturation
2. Pellet
3. Elute
4.Transcription based
5.Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (AMV-RT)
6.Primer
7.Electrochemiluminescence (Ecl)

تمام این وقایع در دمای ۴۱°C و به مدت ۹۰ دقیقه انجام می گیرد وحداقل میزان تکثیر ۱۰۹ برابر تعداد مولکول الگوی اولیه می باشد.

فرآورده های این واکنش علاوه بر مقادیر زیادی از RNA دارای مقادیر اندکی از هیبرید DNA-RNA و DNA دو رشته ای نیز می باشد [۲، ۵ و ۷] .



شکل شماتیک فرایندهای واکنش NASBA [۷]:

در NASBA رشته RNA که در نمونه اولیه وجود دارد ، به عنوان رشته سنس sens است اگرچه DNAی حاصل از رشته های سنس و آنتی سنس RNA تا حدی با همدیگر تفاوت دارند, اما از لحاظ کینتیکی مشابه هستند و به عنوان کپی DNA تلقی می شوند [۱۹].

برای انجام این واکنش ها در آغاز مخلوط واکنش حاوی مخلوط آغازگرها, مخلوط بافری وDNA یا RNA یا ویروس خالص سازی شده(به عنوان الگو) را آماده می کنیم.

در صورت استفاده از RNA به عنوان الگو به مدت ۵ دقیقه این مخلوط را در ۶۵°C گرم می کنیم تا ساختار دوم RNA ناپایدار گردد.

سپس در مدت ۵ دقیقه حرارت را به ۴۱°C می رسانیم تا در این مدت آغازگرها به الگو پیوند شوند. پس از این مدت مخلوط آنزیمی را به مخلوط اضافه کرده و در ۴۱°C قرار می دهیم تا واکنش ها برابر فرایند گفته شده ادامه یابد [۱۶] .

چون این واکنش هم دما بوده و نیاز به تغییر دما ندارد، نیازمند تجهیزات مخصوصی نیست و در حمام آب گرم و هات بلاک و یا حتی در انکوباتور نیز انجام می گیرد. بنابراین این تکنیک در جایی که محدودیت بودجه ای از لحاظ خرید تجهیزات وجود دارد مناسب می باشد [۷].

نمونه ای از مواد مخلوط واکنش برای این تکنیک[۳]:

5×NASBA buffer: 200 mM Tris–HCl, pH 60 ,8.5 mM MgCl350 ,2 mM KCl, 2.5 mM DTT, 5 mM of each dNTP, 10 mM each of ATP, UTP and CTP, 7.5 mM GTP and 2.5 mM ITP .
5× primer mix: %75 DMSO and 1 mM each of antisense and sense primers.
Enzyme mix:375 mM sorbitol, 2.1 mg BSA, 0.08 U RNase H, 32 U T7 RNA polymerase and 6.4 U AMV-reverse transcriptase.
Adding 1 µl of input material (purified RNA, DNA or purified virus)

بسیاری از روش های تکثیری اسید نوکلئیک وقت گیر است و نیازمند مهارت فردی برای بهینه کردن وتجزیه و تحلیل نتایج را دارد، در این میان بهینه سازی روش NASBA تا حدی ساده است.
برای بهینه کردن این واکنش نیاز به تنظیم غلظت مواد داخل مخلوط واکنش است. برای نمونه در غلظت کم RNaseH، هیبرید DNA-RNA تجمع یافته و باعث افزایش میزان RNA تک رشته ای فراورده می شود. ولی با افزایش غلظت RNaseH، تجزیه هیبرید DNA-RNA آن چنان سریع می شود،که باعث کاهش میزان RNA تک رشته ای فراورده می شود.
با اضافه کردن DMSO به مخلوط این واکنش و بهینه سازی میزان غلظت هر سری آغازگری، می توان باعث کاهش زمینه و افزایش ویژگی این روش شود. توالی آغازگرها و جایگاه های پیوند آن ها اختصاصی بودن این روش تکثیری را فراهم می کند. به همین دلیل لازم است که داده های کافی در نواحی حفاظت شده در توالی های هدف وجود داشته باشد [۲].

طراحی آغازگر:

تکثیر اختصاصی RNA در PCR تنها به شرطی فراهم می شود که از آغازگرهایی که از ناحیه غیر کد شونده (اینترون) طراحی شده اند، استفاده نشود. استفاده از این چنین آغازگرهای اختصاصی شناسایی mRNA پردازش شده را امکان پذیر می سازد.
اما با تکثیر اختصاصی DNA توسط NASBA می توان آغازگرهای P1 و P2 را از ناحیه غیر کد شونده (اینترون) طراحی کرد. از سوی دیگر می توان در نواحی از ژن که کمتر محافظت شده اند هم در طراحی آغازگر استفاده کرد [۲].

منحنی تولیدی فرآوردهای تکثیری:

در ابتدا غلظت آغازگر نسبت به غلظت کل RNA هایی که باید تکثیر شوند بسیار بالا می باشد. به طوری که هنگام ارزیابی نمونه هایی با حجـــم زیاد، شمار کپی RNAهایی که وارد چرخه تکثیر می شوند $۱۰^{۵}$-$۱۰^{۶}$ می باشد، در حالی که غلظت آغازگرها $۱۰^{۱۲}$ است.
بنابراین در این تکنیک غلظت آغازگر، عامل محدود کننده نخواهد بود و افزایش لگاریتمی[1] خواهد داشت. اما گاهی غلظت آغازگر محدود کننده می شود و تا حد صفر می رسد. در این مرحله سطح cDNA به بیشترین مقـدار می رسد و تولید RNA آنتی سنس به بالاترین میزان خود می رسد.
بنابراین از این لحظه به پس تنها واکنشی که می تواند رخ دهد تولید RNAآنتی سنس برپایه فعالیت RNA پلیمراز T7 از روی الگوی cDNA است.

دراین حالت افزایش RNA به صورت خطی[2] در می آید، در واقع در این مرحله است که مقادیر RNA ،که از لحاظ کمیت سنجی دارای اهمیت می باشند، تولید می شود. این فاز به عنوان فاز نسخه برداری است و تا مدتی طولانی ادامه می یابد.
پس از گذشت زمان به دلیل کمبود ذخیره نوکلئوتیدی و از بین رفتن فعالیت آنزیم ها سرعت نسخه برداری وارد سیر نزولی می شود [۱۹]

سیستم‌های شناسایی[3] فرآورده های NASBA

تشخیص و شناسایی فرآوردهای برآمده از تکثیر[4] با استفاده از ژل ها و رنگ آمیزی آن ها، سیستم کاوشگر، بلاتینگ،ELGA[5] و یا با استفاده از تکنیک (Electrochemiluminescence (Ecl انجام می گیرد. این روش ها ناهمگن بوده و نیازمند جابجایی دستی یا روباتیک نمونه ها می باشد.
از سوی دیگر این روش ها بسیار وقت گیر بوده و مواقعی که تعداد نمونه ها زیاد باشد محدودیت زمانی ایجاد می کند و هزینه بر است. همچنین احتمال آلوده شدن نمونه ها در این روش ها نیز وجود دارد [۵].
روش همگن شناسایی که در آن سیگنال های اختصاصی، هم زمان با تکثیر توالی هدف ایجاد می شود، برای بررسی نمونه های زیاد مناسب هستند.
از سوی دیگر با استفاده از این روش ها دیگر نیازی به باز کردن مخلوط واکنش نیست، پس خطر آلودگی پسی فرآورده ها نیز کاهش خواهد یافت. برای این نوع شناسایی از سنجش میزان فلورسنت ساطع شده از شناساگرهای الیگونوکلئوتیدی هیبرید شونده با توالی هدف به نام مولکول های راهنما (Molecular beacon) استفاده می شود. همچنین از این مولکول ها می توان برای شناسایی فرآورده ها پس از اتمام تکثیر هم استفاده نمود [۵].

1. Exponential
2. Plateau
3. Detection
4. Post NASBA product detection
5. Enzyme-linked gel assay

شناسایی توسط لومینسانس الکتروشیمی Ecl
Electrochemiluminescence

سیستم شناسایی لومینسانس الکتروشیمی پس از تکثیر انجام می گیرد. در این سیستم تابش نور توسط ترکیبات شیمی خاص غیررادیواکتیو پس از تحریک الکتروشیمی به عنوان عامل شناساگر عمل می کند. در لومینسانس الکتروشیمی تفاوت کمی در آغازگر دوم (P2) وجود دارد، به این صورت که آغازگر دوم (P2) دارای توالی شناسایی توسط لومینسانس الکتروشیمی است.

برای شناسایی در این روش از دو الیگو نوکلئوتید استفاده می شود:

۱- شناساگر الیگونوکلئوتید تسخیری[1] بیوتینیله شده که روی یک بید پارا مغناطیسی پوشیده شده با استرپتاویدین ثابت شده است. این کاوشگر مربوط به RNA الگو است.

۲- شناساگر الیگونوکلئوتیدی لومینسانس الکتروشیمی که به کلات روتینیوم[2] پیوند شده است، و مکمل با توالی[3] 3 قسمت تکثیر شده می باشد.

این شناساگر نسخه شناخته شده ای برای آغازگر نیز می باشد. کاوشگر لومینسانس الکتروشیمی از نوع کاوشگرهای عمومی بوده و دارای ناحیه مکمل با RNA الگو است.

با افزایش مقدار کاوشگر درسیستم لومینسانس الکتروشیمی، وضوح[4] افزایش می‌یابد، به طوری که حضور RNAی الگوی مورد نظر تایید می گردد.

برای شناسایی، بیدهای مغناطیسی حامل ترکیب کاوشگر لومینسانس الکتروشیمی، با محصول تکثیری هیبرید شده و توسط نیروی مغناطیسی به الکترود موجود در دستگاه Ecl reader جذب می شود.

در این فرایند دانه های مغناطیسی حامل مجموعه کاوشگر لومینسانس الکتروشیمی و ناحیه تکثیری هیبرید شده با آن، توسط آهن ربا جذب و جدا می شوند.

کاوشگرهای نشاندار شده با روتینیوم از خود نوری را ساطع می کنند که مقدار آن متناسب با مقدار ناحیه تکثیر شده در واکنش متناظر است.

ولتاژ به کار رفته باعث ساطع شدن نور توسط کاوشگر نشانه گذاری شده با روتینیوم می شود.دستگاه، این انرژی نورانی[4] (لومینسانس) ساطع شده را شناسایی کرده و آن را به عدد تبدیل می کند.

در این روش میزان سیگنال زمینه، بسیار کم است. زیرا مکانیزم تحریک کنندگی (الکتریسته) جدای از سیگنال ایجاد شده (نور) است [۱۳،۷].

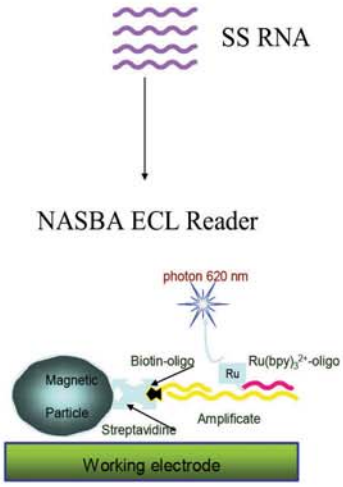
از این روش می توان برای شناسایی و کمیت سنجی فرآورده های تکثیری (QT-NASBA) استفاده کرد. بدین منظور از کنترل های داخلی که دارای مقادیر مشخصی از RNA کالیبره شده هستند، استفاده می شود.

مقادیر مساوی از محصول تکثیرشده و کنترل های داخلی (به عنوان استاندارد کمیت سنجی)، که برای یکی از نمونه ها اختصاصی هستند، به محلول هیبریداسیون اضافه می شود.

این نمونه ها با شناساگر الیگونوکلئوتیدی نشانه گذاری شده با روتینیوم هیبرید می شوند.

نتیجه حاصله که همان میزان نور ساطع شده است، نشان دهنده میزان تکثیر می باشد. محاسبه کمی میزان تکثیر، بر مبنای مقدار نسبی چهار نمونه تکثیری انجام می شود.

از QT-NASBA می-توان برای شناسایی مقادیر بسیار کم پارازیت های موجود در نمونه استفاده کرد [۱۰].



1. Captured probe
2. Ruthenium chelate
3. Resolution
4. Luminescence

سیستم شناسایی توسط مولکول های راهنما (Molecular beacon)

مولکول های راهنما کاوشگر های الیگو نوکلئوتیدی هیبرید شونده تک رشته ای هستند که دارای ساختمان ساقه و حلقه هستند.در این ساختار توالی بخش حلقه کاوشگر، مکمل توالی هدف می باشد. ساقه هم از جفت شدن ۶-۸ نوکلئوتید توالی های جانبی دو بازوی حلقه که بوجود می آید.
یک ماده فلورسنت (Flourophore) به صورت کوالان به انتهای یکی از این بازوها و یک بازدارنده (Quencher) به صورت کووالان به انتهای بازوی دیگر پیوند شده است.
انواع مختلفی از مولکول های راهنمای نشانه گذاری شده با رنگ های متفاوت وجود دارند همانند: TET و FAM که به ترتیب در ۵۳۰ nm و ۵۳۸ nm بیشترین میزان نور فلورسنت از آن ها ساطع می شود. همچنین DABCYL نیز نمونه ای از مواد بازدارنده(Quencher) است.
درصورت فقدان توالی هدف در قطعات تکثیر شده، کاوشگر ساختار ساختار ساقه-حلقه خود را حفظ می کند، که در این ساختار اشتراک الکترونی بین ماده فلورسنت و بازدارنده (Quencher- Fluorophore) باعث کاهش میزان نور فلورسنت ساطع شده می شود.
وقتی توالی هدف در قطعات تکثیر شده، مکمل توالی کاوشگر باشد، تغییراتی در ساختار ساقه- حلقه کاوشگر بوجود آمده و هیبرید توالی هدف- کاوشگر تشکیل می شود. به این معنا که ساختارساقه- حلقه باز شده و با قطعه تکثیر شده جفت می گردد. این جفت شدگی جدید که پایدار و دراز می باشد، از تشکیل مجدد هیبرید ساقه – حلقه جلوگیری می کند.
در این حالت فلورسنت و بازدارنده (Quencher- Fluorophore) از هم فاصله گرفته و در نتیجه انرژی آزاد شده حاصل به صورت نور فلورسنت ساطع می شود که قابل تشخیص می باشد.
میزان حداکثر سیگنال تولید شده ارتباطی با میزان RNAی هدف اولیه استفاده شده ندارد بلکه به مقدار مولکول راهنمای استفاده شده بستگی دارد [۳، ۸].
از مولکول های راهنما می توان برای کمیت سنجی هم استفاده کرد. در این حالت همانند روش پیش مقادیر ثابتی از RNA کالیبره شده به عنوان استاندارد استفاده می شود. این RNA کالیبره شده تنها در بخش کوچکی از توالی خود با نمونه تکثیری هدف متفاوت بوده و قادر به هیبرید شدن با توالی اختصاصی مولکول راهنما است [۱۹].
نمونه ای از توالی ملکول راهنما:(زیر توالی ساقه خط کشیده شده است)

(MB: DABCYL) 6-FAM-5'-CTTGCGGGATAGGGAACAGCGGCGGCGCAAG-3

در این تکنیک شکل منحنی شناسایی فرآورده ها تکثیری به دو عامل زیر (که هر دو وابسته به زمان است) بستگی دارد[۱۹]:
۱- افزایش میزان RNA
۲- اتصال RNA به Mb

Real-Time NASBA

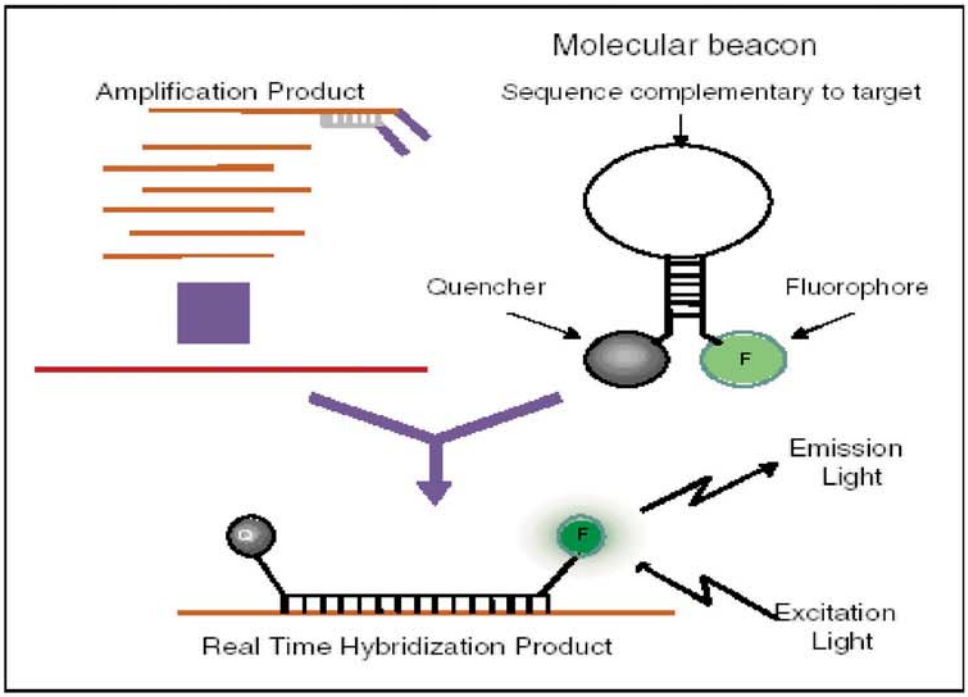
مولکول های راهنما را می توان به صورت Post-NASBA یعنی پس از اتمام مراحل تکثیری استفاده کرد. اما اگر به مخلوط واکنش پیش از انجام تکثیر مولکول های راهنما اضافه کنیم و نور فلورسنت ساطع شده را به طور همزمان با افزایش زمان واکنش اندازه گیری کنیم، این تکنیک به صورت هم زمان یا Real-Time در می آید.
با این روش دیگر نیازی به استفاده از مرحله جداگانه ای برای شناسایی با استفاده از ژل نیست که باعث کاهش ریسک آلودگی می گردد.
از این روش برای ردیابی چندین نوع مولکول هدف در یک واکنش مشابه با چند سری آغازگری متفاوت می توان کمک گرفت.
در این صورت باید از چندین نوع مولکول راهنما که با رنگ های متفاوتی نشانه گذاری شده اند استفاده کرد، که هر کدام از آن ها دارای توالی شناساگر اختصاصی برای یک واحد تکثیر یافته خاص باشند.
به این صورت که هر ویال که دارای مخلوط واکنشی مشابه بقیه ویال ها ولی با مولکول های راهنمای متفاوت می توان یک توالی هدف را شناسایی کرد [۳].

AmpliDet RNA

اگر برای تکثیر در NASBA از RNA به عنوان الگو استفاده شود و از مولکول های راهنما برای شناسایی همزمان در یک ویال بسته استفاده شود از آن به عنوان AmpliDet RNA نام برده می‌شود [۳، ۱۷].

نور فلورسنت اندازه گیری شده پیش و پس از واکنش:

شکل شماتیک نحوه عمل مولکول های راهنما در شناسایی:



کاربردها

NASBA بطور موفقیت آمیزی درشناسایی و توالی یابی توالی های mRNA و RNA های ویروسی، باکتریایی و قارچی در نمونه های گیاهی عمل کرده است.

این تکنیک روش مناسبی برای شناسایی بیماری ویروسی[1] PVY و[2] PLRV سیب زمینی، توت فرنگی[3] SVBV، بیماری باکتریایی Ralstonia solanacearum (سیب زمینی ، نیشکر)، تشخیص سریع در مراحل اولیه آلودگی در نمونه های بیمارستانی(HIV-1, HepatitisB) ، دامپزشکی و عوامل آلوده کننده آب (Cryptosporidium parvum)ومواد غذایی(Listeria monocytogenes, Salmonella enterica) می باشد [۳، ۱۰، ۱۳، ۱۸].

1. Potato Y virus
2. Potato leaf roll virus
3. Strawberry vein banding virus

در کل این تکنیک برای بررسی بیماری های عفونی، بی نظمی های ژنتیکی انسان، شناسایی و بررسی سرطان، موارد مشکوک بیماری ها می توان استفاده نمود. همچنین این تکنیک کاربرد گسترده ای از شناسایی عوامل بیماری زا تا تشخیص فعالیت های بیولوژیکی مانند بیان ژن و قدرت زیستی موجودات دارد.

از سوی دیگر با ترکیب شدن تکثیر و هیبرید شدن و مرحله شناسایی می توان چند شکلی تک نوکلئوتیدی را نیز تشخیص داد [۵، ۶].

از آن جایی که پایداری RNA در مقایسه با DNA بسیار کم می باشد، شناسایی RNA، شاخص مناسبی در زنده بودن موجود است. بنابراین به دلیل حساسیت بالای این تکنیک و روش های ویژه شناسایی می توان از این روش برای تشخیص قدرت زیستی باکتری E.Coli به عنوان باکتری شاخص آلودگی در آب استفاده کرد [۱۴].

کاربرد NASBA در شناسایی چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP's[1])

مولکول های راهنما می توانند به دو حالت فیزیکی مختلف پایدار وجود داشته باشند و به همین دلیل بسیار حساس و دقیق عمل می کنند.

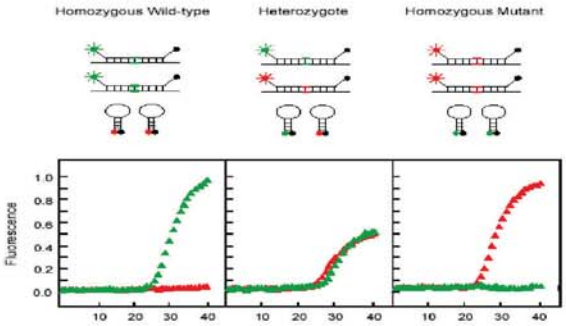
در یک حالت انرژی مولکول راهنما در ساختار ساقه کاوشگر ذخیره می شود و در حالت دیگر با تشکیل هیبرید جدید کاوشگر و قطعه تکثیر شده انرژی موجود در ساختار ساقه- حلقه به صورت نور فلورسانت آزاد می شود.

در طراحی مولکولهای راهنما طول توالی کاوشگر را به اندازه‌ای در نظر می گیرند که هیبرید هدف- کاوشگر پایدارتر از هیبرید ساقه- حلقه باشد، در نتیجه مولکول راهنما بطور خودبخودی هیبریدهای کاوشگر- هدف فلورسنت تشکیل می دهد.

با این حال اگر تنها در یک نوکلئوتید در توالی هدف مکمل توالی کاوشگر اختلاف[2] باشد، ساختار ساقه- حلقه کاوشگر پایدارتر از ساختار کاوشگر- هدف خواهد بود. پس می توان با همزمان کردن تکثیر قطعه DNA و هیبرید شدن مولکول راهنما با قطعات تکثیری، SNPs را تشخیص داد [۳].

تکنولوژی NASBA روش مناسبی برای تکثیر DNAی فاقد آلودگی RNA می باشد. این روش که قدرت تشخیص سریع، آسان و Real-Time را دارد می تواند چندشکلی تک نوکلئوتیدی در توالی DNA را تشخیص دهد.

در این گونه موارد از دونوع مولکول راهنما با رنگ های متفاوت که در توالی آنها فقط در یک نوکلئوتید اختلاف دارند استفاده نمود. اگر DNA هموزیگوت باشد سیگنال مثبتی از مولکول راهنمای استفاده شده با رنگ خاصی را خواهیم داشت و سیگنال مولکول راهنمای دیگر ضعیف خواهد بود. اما اگر DNA هتروزیگوت باشد هر دو سیگنال قابل مشاهده خواهند بود [۶].



مزایای NASBA

روی هم رفته شرایط تکثیر در این روش کم و بیش ثابت است، و بهینه سازی شرایط برای هر ارزیابی نسبت به روش PCR ساده تر می باشد.

از سویی معیارهای طراحی برای آغازگر در این روش دشوار نیست و طراحی آغازگر به سادگی برای هر ژنی صورت می گیرد[۱۴]. در صورت تکثیر DNA می توان برای طراحی آغازگر حتی از ناحیه اینترون هم استفاده کرد.

فرآورده های تکثیری NASBA تک رشته ای بوده و در مرحله آخر در صورت استفاده از شناساگرهای هیبرید شونده نیازی به مرحله حرارت دهی برای واسرشته سازی ندارند [۷].

NASBA
به طور موفقیت آمیزی درشناسایی و توالی یابی توالی های mRNA و RNA های ویروسی، باکتریایی و قارچی در نمونه های گیاهی عمل کرده است.

1. Single nucleotide polymorphism (SNP)
2. Mismatch

سهولت، حساسیت بالا، میزان کم نمونه مورد نیاز برای آغاز واکنش، شمار نسخه های تکثیری فراوان، بی نیازی به دستگاه ترمال سایکلر، توانایی تکثیر و تشخیص هم زمان و سریع و ارزیابی کمی وکیفی از برتری های این روش می باشد [۱۴].

به دلیل فقدان مرحله واسرشت سازی حرارتی DNA ژنومی تکثیر نمی شود و آلودگی دیده نمی شود. همچنین این روش قادر به تشخیص بیش از یک نمونه در واکنش است. ساده بودن روش شناسایی به وسیله کاوشگر های هیبریدی از دیگر مزایای این روش است.

این روش توانایی تکثیر و تشخیص به طور هم زمان را فراهم می کند، در نتیجه زمان بررسی کاهش یافته و به بررسی پس از تکثیر (به الکتروفورز کردن) نیازی نیست.

این تکنیک در عین حال روش بسیار مناسبی برای شناسایی و تعیین ویژگی های mRNA می باشد.

در NASBA مولکول های آنتی سنس mRNA تک رشته ای پدید می آیند که می توان مستقیماً از آن ها به عنوان کاوشگر استفاده کرد.

RT-PCR برای تشخیص RNA مناسب نیست. در حالی که NASBAاین نقطه ضعف را ندارد و با حساسیت بسیار بالایی می تواند mRNA را در زمینه DNA تشخیص دهد.

در این روش فعالیت هر سه آنزیم، هر مولکول اسید نوکلئیک را به تعداد $۱۰^{۹}$ نسخه تکثیر می کنند.

این کار تنها در ۹۰ دقیقه انجام می شود که در مقایسه با PCR زمان کوتاهی است. همچنین NASBA در مقایسه با PCR به دلیل افزایش لگاریتمی که نتیجه بیان مداوم پروموتر است، نیاز به چرخه های کمتری دارد. از آن جایی که اشتباه ذاتی در فعالیت آنزیم ها (آنزیمی مانند نسخه بردار معکوس) خاصیت جمع پذیری دارد با کاهش تعداد چرخه ها میزان خطاها کاهش می یابد.

درستی و صحت فرایند NASBA با توالی یابی مستقیم فرآورده های RNA حاصله آزمایش و تایید شده است.

از توالی یابی به این طریق حدود ۹۰٪ آن خوانا بوده و ۱۰٪ ناخوانا بودن به دلیل توقف های ذاتی آنزیم ها یا تجزیه رشته بوده است که این حالت در نمونه های خالص نشده احتمالاً وجود دارد [۲].

معایب NASBA

از موارد بسیار مهمی که باید با آن دقت کرد تا حساسیت و اختصاصیت این روش تحت تاثیر منفی قرار نگیرند، عبارتند از: اثر باز های مواد مورد استفاده که می تواند مانع از تکثیر هدف و ایجاد نتایج اشتباه مثبت (False- negative) شود.

نتایج اشتباه مثبت می تواند به دلیل تکثیر غیر اختصاصی اجزا وابسته به مواد مصرفی نیز رخ دهد که این مشکل را می توان با رقیق کردن نمونه ها برطرف کرد [۱۳].

چون این واکنش هم دما است امکان کنترل میزان واکنش به وسیله تنظیم تعداد چرخه های تکثیری وجود ندارد. پس امکان به وجود آمدن تداخل های غیر اختصاصی هم وجود دارد.

از سوی دیگر به دلیـــل دناتوره شدن آنزیم ها در دمای بالاتر از ۴۱°C نمی توان دما را تغییر داد تا تکثیر اختصاصی صورت گیرد.

در واکنش RT-NASBA فعالیت آنزیمی RNA پلیمراز T7 باعث تولید RNA آنتی سنس می شود که به عنوان سوبسترایی برای چرخه های پسی تکثیر عمل می کنند.

در صورت وجود مولکول های راهنما ممکن است رقابتی بین شناساگر و RNA پلیمراز T7 به وجود آید که باعث توقف سنتز RNA و در نهایت کاهش میزان محصول تکثیری شود [۵].

مقایسه PCR وNASBA :

درNASBA وجود ۰/۴ ηgr از RNA هدف برای شناسایی کافی است که مقدار کمی در مقایسه با میزان ۴ηgr مورد نیاز در RT-PCR است.

در مقایسه PCR و NASBA از لحاظ حساسیت در مقادیر مساوی از نمونه، حساسیت NASBA بیشتر است. حساسیت یک مرحله از NASBA معادل سه مرحله از RT-PCR است که به نوبه خود باعث کاهش میزان ریسک آلودگی می شود، پس می تواند جایگزین مناسبی برای شناسایی انترو ویروس ها باشد.

درجه حرارت کم این روش باعث تکثیر اختصاصی RNA می شود، پس در مقایسه با RT-PCR وجود DNA در زمینه[1] NASBAمشکل ساز نخواهد بود [۱۴].

1.Background

References

1. Compton. J. 1991. Nucleic acid sequence based-amplification. Nature. 92-350:91.

2. Kievits, T. and B. van Gemen, D. van Strijp, R. Schukkink, M. Dircks, H. Adriaanse, L.Maiek, R. Saoknanan, P. Lens. 1991. NASBATM isothermal enzymatic in vitro nucleicacid amplification optimized for the diagnosis ofHIV- 1 infection. Journal of Virological Methods.. 286-35:273

3. Klerks. M.M. and G.O.M. Leone, M. Verbeek, J.F.J.M. van den Heuvel, C.D. Schoen. 2001. Development of a multiplex AmpliDet RNA for the simultaneous detection of Potato leafroll virus and Potato virus Y in potato tubers. Journal of Virological Methods 125–115 :93

4. Guatelli, J.C. and K.M. Whitfield, D.Y. Kwoh, K.J. Barringer, T.R. Gingeraso, D.D. Richman. 1990. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a multi enzymereaction modeled after retroviral replication. Proc. Natural Academic Science. 1878-1874 :87

5. Leone, G. And H. van Schijndel, B. van Gemen, F.R. Kramer, C.D. Schoen. 1998. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA. Nucleic Acids Research. 2155–2150 :(9)26

6. Berard, C. and M.A. Cazalis, P. Leissner, B. Mougin. 2004. DNA nucleic acid sequence-based amplification-based genotyping for polymorphism analysis. BioTechniques 686-37:680

7. Ginocchio, C.C. 2004. Life Beyond PCR: Alternative Target Amplification Technologies for the Diagnosis of Infectious Diseases, Part I. Clinical Microbiology Newsletter. 128-122:(16)26

8. Kramer, F. R. Introduction to Molecular Beacons. www.molecular-beacons.org

9. Wharam, S.D. and D. Marsh, J.S. Lloyd, T.D. Ray, G.A. Mock, R. Assenberg, J.E. Mcphee, Ph. Brown, A. Weston, D.L.N. Cardy. 2001. Specific detection of DNA and RNA targets using a novel isothermal nucleic acid amplification assay based on the formation of three-way junction structure, Oxford University Press. Nucleic Acid Research. 11) 29e54)

10. Lieberman, B.Y. 1998. NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNIQUES AND
EVALUATION OF RNA QUANTITATION ASSAYS IN HIV 1 SUBTYPE B VIRUS.
CONFERENCE ON THE LABORATORY SCIENCE OF HIV : 122-119

11. Rajendran, M. and A.D. Ellington. 2003. In vitro selection of molecular beacons. Nucleic Acids Research, -5700 :(19)31 5713

12. Boom, R. and C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. WertheimER-van -Dillen, J. Vander Noordaa. 1990. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. Journal of clinical microbiology, 503-495 :(3)28

13. NASBA compared to RT-PCR. Scientific references and quotes comparing the two technologies. http://www.ibi.cc/NASBA+PCR.htm

14. NASBA. Step by step. http://www.ibi.cc/new_page_1.htm.

15. Kwoh, D.Y. and T.J. Kwoh. 1990 . Target amplification systems in nucleic acid-based diagnostic approaches. Am Biotechnol Lab. 25-14:(13)8.

16. Tai, J. H. and M.S. Ewert, G. Belliot, R.I. Glass, S.S. Monroe. 2003. Development of rapid method using nucleic acid sequence-based amplification for detection of astrovirus. Journal of virological methods. 127-110:19.

17. Chan, A.B. And J.D. Fox,. 1999. NASBA and other transcription-based amplification methods for research and diagnostic microbiology. Review in medical Microbiology. 196-185 :10

18. Vaskova, D. and J. Spak, M.M. Klerks, C.D. Schoen, J.R. Thompson , W. Jelkmann
2004. Real-time NASBA for detection of Strawberry vein banding virus. European Journal of Plant Pathology –213 :110 221.

19. Weusten, J.J.A.M. and W.M. Carpay, T.A.M. Oosterlaken, C. A. M. van Zuijlen , P. A. van de wiel. 2002. Principles of quantitation of viral loads using nucleic acid sequence based-amplification in combination with homogeneous detection using molecular beacons. Nucleic Acids Research, 6)30e): 7-1