محمد فرزانه خواه
کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی، گرایش میکروبیولوژی

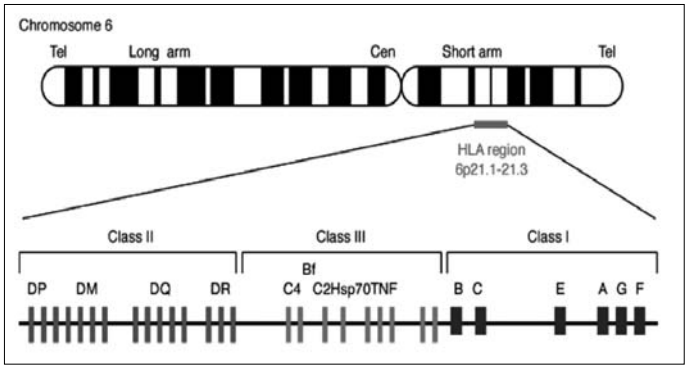
مقایسه ویژگی دو روش نواری و لکه ای در SSO–HLA typing

پیش گفتار

چنان که می دانیم MHC به گروهی از پروتیین ها گفته می شود که آنتی ژن های درون سلولی را به لنفوسیت های T عرضه می کنند. این پروتیین ها به وسیله ژن های موجود در جایگاهی موسوم به کمپلکس اصلی سازگاری بافتی رمز می شوند. گیرنده های لنفوسیت های T در واقع مجموعه ای متشکل از مولکول های MHC و آنتی ژن های پپتیدی بیگانه را شناسایی می کنند. به مولکول های MHC در انسان، HLA گفته می شود.

سیستم HLA در MHC بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۶ انسانی در بخش ۶p۲۱.۳ جای دارد. این سیستم پروتئین هایی را کد می کند که کار آن ها پیوند با پپتیدها و نمایاندن آنها به نام آنتی ژن در روی سلول های بیان کننده ی آنتی ژن است، تا با گیرنده سلول های T به پیوندد.

بر اساس ساختار پروتئینی و کارکرد سیستم HLA به سه دسته بخش می شود، که به نام های HLA class I, II, III نامیده می شوند. زیر گروه های A,B,C در کلاس یک و زیر گروه های DP,DM,DOA,DOB,DQ,DR در کلاس دوجای دارند، که از این دسته DP,DQ,DR نقش مهم تری دارند. زیر گروه های فرعی دیگری نیز در این



کلاس ها وجود دارد که نقشی مهمی در پیوند نداشته و اهمیتی برای انجام تایپینگ آن ها یافت نشده است.

هر کس دارای ۲ هاپلوتایپ از توده ی HLA انسانی است. یکی را از پدر و دیگری را از مادر به ارث برده است. بنابراین درصد برابری HLA هر کس با برادر و یا خواهرش، ۲۵٪ خواهد بود.

سیستم HLA از نگاه فرگشتی در ژنوم انسانی به عنوان سیستمی که بیشترین پلی مورفیسم را در خود دارد شناخته شده است. از این رو بررسی این سیستم در پژوهش های اپیدمیولوژی نیز کاربرد دارد.

گفته می شود لکوس A دارای ۴۵۱ آلل، لکوس B دارای ۷۸۲ و همچنین لکوس DR دارای ۵۲۵ آلل است.

شناخت و تایپ سیستم HLA برای کاربردهای زیر کارایی دارد:

- به عنوان یک مارکر اپیدمیولوژیک
- برای ترانسفیوژن پلاکت سازگار در بیماران مقاوم
- سازگاری پیوند و کاهش میزان GVHD
- شناسایی بیماری های خودایمنی در ارتباط با HLA
- تست ابوت و تعیین هویت

کاربردهای تعیین HLA فراتر از گفته های بالا است و کارایی های گسترده تری دارد. دراین میان، بررسی B×۵۷۰۱ در بیماران ایدزی، امروزه برای شناخت حساسیت های شدید دارویی با این آلل انجام می شود.

روش های تعیین HLA

تایپینگ HLA به دو روش سروتایپینگ و مولکولی انجام می شود.

در سروتایپینگ، که به روش لینفوسایتوتوکسیسیتی انجام

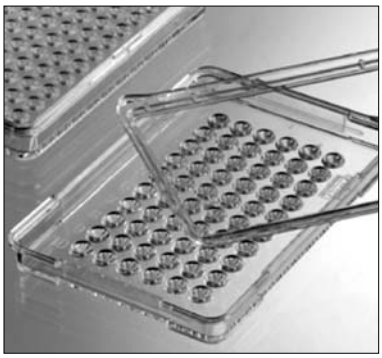
می پذیرد، لنفوسیت های جدا شده از خون محیطی، در چاهک های موجود در پلیت های میکروتست تحت عنوان ترازاکی با آنتی سرم های HLA مجاور می شود. پس از آن با اضافه کردن کمپلمان به کمپلکس مذکور، در صورت وجود گیرنده های آنتی ژنی بر سطح لنفوسیت ها، لیز سلولی اتفاق خواهد افتاد که با نفوذ رنگ ائوزین به داخل سلوهای لیز شده، در زیر میکروسکوپ قابل رویت خواهند بود. امروزه این تکنیک در مراحل مقدماتی شناسایی، دهنده پیوند مناسب و همچنین بررسی تک آنتی ژنی HLA های مستعد بیماری ها، به دلیل صرف هزینه پایین در مقایسه با روش های مولکولی، کاربرد دارد. استفاده از خون محیطی تازه، واکنش های تقاطعی آنتی ژنیک و نیاز به تجربه بالا در تفسیر نتایج از عوامل محدود کننده برای انتخاب این تکنیک است.

در روش ژنوتایپینگ، از سه تکنیک SSP, SSO, SBT استفاده می شود.

در متد SBT، با توجه به ارزیابی نتایج با بالاترین میزان تفکیک آللیک برای هر لوکوس HLA توسط سکانس محصولات PCR، این تکنیک را از مناسب ترین روش ها معرفی کرده است. هرچند که شناسایی آلل های جدید نیز تنها با استفاده از این تکنیک قابل انجام است ولی صرف زمان و هزینه بالا از یک سو و تفسیر نه چندان راحت نتایج از سوی دیگر، استفاده از این روش را در شرایطی خاص امکان پذیر کرده است.

در روش SSP ، از مجموعه پرایمرهای طراحی شده برای هر لوکوس استفاده می شود. پس از انجام PCR و سپس الکتروفورز محصولات آن، نتایج بررسی و گزارش می شود. کیت های تجاری موجود معمولا برای تایپ هر لکوس A, C, DR تعداد ۲۴ میکس PCR و برای لکوس B تعداد ۴۸ میکس در نظر می گیرند. تعداد میکس های بیشتر لکوس B مربوط به تنوع آللیک بیشتر در این لکوس است.

اغلب از یک جفت پرایمر مربوط به ژن های با توالی حفاظت شده نیز مانند G۳PDH ، به عنوان کنترل داخلی در هر واکنش استفاده می شود تا از صحت انجام تست اطمینان حاصل شود. روش SSP به دلیل هزینه پایین تر نسبت به SBT و البته قدرت تفکیک آللیک بالاتر نسبت به روش سروتایپینگ، مورد استفاده بسیار قرار می گیرد. از



روش SSP نیز می توان برای تایپینگ HLA با تفکیک بالا نیز استفاده نمود که به تعداد مجموعه پرایمری بیشتری نیازمند است.

تکنیک SSO با صرف زمان کمتر در تایپینگ همزمان چندین نمونه، قدرت تفکیک بالاتر نسبت به روش های SSP و سرولوژی، روش منتخب تایپینگ در مراکز بانک های خون بندناف و Stem Cell است. گفته می شود کسب نتایج مبهم در این روش نسبت به روش SSP بالاتر است. در متد SSO با استفاده از پرایمرهای بیوتینیله شده، محصول بدست آمده، به پروب های الیگونوکلئوتیدی متصل به بستر جامد، اتصال یافته و پس از هیبریداسیون و سپس رنگ آمیزی بوسیله کروموژن و TMB قابل ارزیابی خواهد بود.

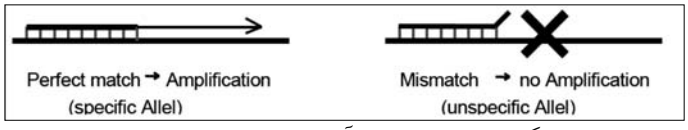
از دیگر روش های مولکولی که در این امر استفاده شده، تکنیک های RealTimePCR , PCRRFLP را می توان نام برد که با توجه به نقیصه ها، مشکلات و هزینه های بالا هنوز به مرحله تولید تجاری نرسیده اند.

نگاهی جامع بر تکنیک SSO و مقایسه دو روش انجام آن

تفاوت در فازهای جامدی که

◀جدول ۱) مقایسه تعداد پروب های استفاده شده در هر کیت برای هر لوکوس HLA

Locus	Membrane Strip	Miniature Spot
HLA-A	۴۳	۶۵
HLA-B	۶۶	۱۰۴
HLA-C	۲۸	۶۹
HLA-DRB1	۶۲ و ۳۷	۸۳
HLA-DQB1	۳۸	۳۵
HLA-DPB1	۲۴	۴۱
HLA-DQA1	۳۵	-



پروب های الیگونوکلئوتیدی به آنها اتصال یافته، انواع روش های SSO را تعیین می نماید. در دو متدی که مورد مقایسه قرار خواهد گرفت، پروب ها، متصل به نوارهای سلولزی و چاهک های میکروتیتر هستند؛ در روش اول نتایج مثبت، به صورت باندهای تیره و در متد دوم به شکل نقاط تاریک مشخص می شوند.

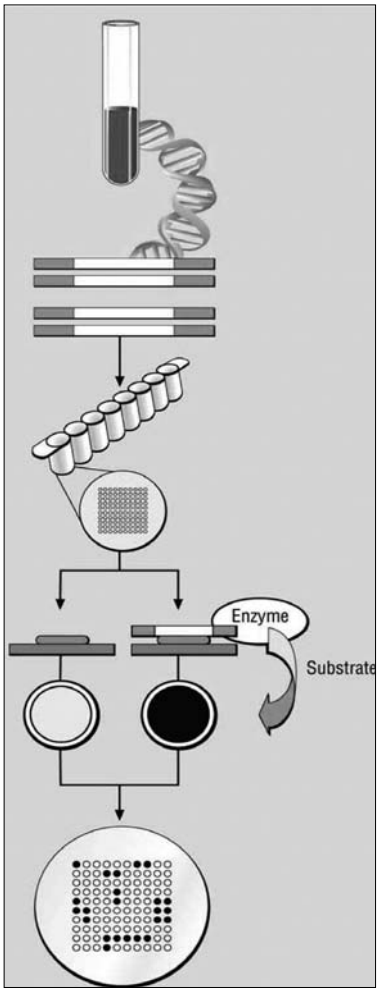
استخراج، آمپلیفیکاسیون، هیبریداسیون، رنگ آمیزی، ثبت و آنالیز نتایج، مراحلی هستند که در تمامی روش های تکنیک SSO انجام می پذیرد.

اولین گام در این تکنیک همچون روش های مولکولی دیگر، انجام استخراج DNA است. انتخاب متد مناسب جهت استخراج، بسته به سیاست حاکم بر آزمایشگاه متفاوت است. محدودیتی در این انتخاب وجود نداشته و تنها ممکن است میزان استفاده از DNA در متدها کمی متغیر باشد که به دلیل تفاوت اندک آن ها، این مرحله در مقایسه ما قرار نمی گیرد. فراهم آوری DNA ای با خلوص بالا تنها شرط لازم در تمامی روش های SSO است.

آمپلیفیکاسیون در هر دو روش نواری و لکه ای با استفاده از پروتوکل و مواد آماده مورد نیاز انجام می گیرد با این تفاوت که در روش نواری، از ۲ پروتکل که یکی مربوط به کلاس یک و دیگری جهت انجام آمپلیفیکاسیون برای کلاس دو است برخوردار بوده. در حالی که در روش لکه ای تمامی لکوس ها با استفاده از یک دستورالعمل انجام گرفته، و این روند کار را به مراتب راحت تر نموده است. محدودیتی در انتخاب دستگاه های ترموسایکلر برای انجام آمپلیفیکاسیون در تمامی روش ها وجود نداشته و فقط توصیه می شود تا از ramprate های بالای ۲/۵ درجه بر ثانیه استفاده نشود تا بر کیفیت محصولات مورد نظر خللی ایجاد نشود. در تکنیک SSO از پرایمرهای بیوتینیله شده استفاده می شود تا پس از مرحله هیبریداسیون با اضافه کردن سوبسترای رنگ زا، نتایج مثبت قابل آنالیز باشد.

هیبریداسیون به اتصال محصولات PCR به پروب های الیگونوکلئوتیدی اطلاق گشته که در ادامه آن رنگ زایی صورت می گیرد. این دو مرحله با هم در دستگاه های اتوماتیک مربوطه در هر دو روش به شرح ذیل انجام می گیرد.

پس از اتصال آمپلیکون های حاوی بیوتین به پروب های SSO ، اضافه کردن کنژوگه استرپتاویدین-آلکالین فسفاتاز سبب می شود تا

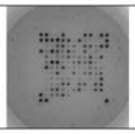


کنژوگه به بیوتین آمپلیکون ها اتصال یابد. در مرحله بعدی محلول سوبسترای BCIP/NBT اضافه می شود تا با اتصال به آلکالین فسفاتاز ایجاد رنگ آبی ارغوانی کند.

پس از مراحل هیبریداسیون و رنگ آمیزی، در روش نواری ابتدا نوارها به دستگاه اسکنر مربوطه توسط کاربر انتقال داده می شود و پس از آن تصاویر نتایج ثبت می شود. در روش لکه ای عکس برداری از چاهک ها به صورت خودکار بلافاصله پس از مرحله رنگ زایی صورت گرفته و سپس به نرم افزار آنالیز انتقال می یابد.

آنالیز نتایج بر اساس میزان شدت

◀جدول ۲)
بررسی تفاوت‌های دو تکنیک نواری و لکه‌ای

شرح تفاوت	روش نواری	روش لکه ای
نحوه قرار گیری پروب ها		
پروتوکل آمپلیفیکاسیون	دو پروتوکل، برای کلاس های یک و دو	یک پروتوکل برای تمامی لوکوس ها
رقیق سازی بافرها	کنژوگه، سوبسترا، محلول شستشو	کنژوگه
گرم کردن اولیه بافرها	بافر هیبریداسیون، بافر شستشو	بافر هیبریداسیون، بافر شستشو
میزان مصرف بافرها	حدود ۲۰ برابر بیشتر نسبت روش دیگر	به دلیل طراحی مینیاتوری پروب ها
مراحل تمام اتوماتیک دستگاه	دناتوراسیون تا رنگ زایی	دناتوراسیون تا آنالیز نتایج
مراحل غیر اتوماتیک از هیبریداسیون تا آنالیز	انتقال دستی نوارها به اسکنر	تمامی مراحل به صورت خودکار انجام میگردد
میزان زمان انجام مراحل غیرخودکار	حدود ۱ ساعت	حدود ۰/۵ ساعت
حداکثر میزان انجام تست در هر بار	۹۶ تست برای هر لوکوس	۲٤ تست از A,B,DRB و ٤۸ تست از C,DQ,DP
قابلیت انجام همزمان لوکوس ها	خیر	بلی
حداقل و حداکثر زمان انجام یک ران کاری	۲ الی ۳/۵ ساعت (فقط هیبریداسیون)	۱/۵ الی ۳ ساعت
شستشوی بعد از کار	به صورت خودکار پس از اتمام کار	تنها هر ۳ ماه یکبار نیاز به پروتوکل شستشو دارد
کیت های قابل دسترس	HLA-A,B,C,DRB,DQB,DPB,**DQA**	HLA-A,B,C,DRB,DQB,DPB
سایر کیت های تشخیصی قابل انجام	HIV, HCV, HBV, Syphilis	هنوز در دسترس نمی باشد.
نمایی از دستگاه		
تصویری از نرم افزار آنالیز نتایج		

رنگ های ایجاد شده در مقایسه با cut off آن ها صورت می گیرد تا پروب های مثبت و منفی مشخص شود. تمامی نتایج محتمل بر اساس پروب های مثبت و منفی توسط نرم‌افزار های مربوطه گزارش می شود.

با توجه به طراحی مینیاتوری پروب هادر روش لکه ای و استفاده از تعداد پروب های بیشتر به کار برده شده برای هر لوکوس HLA در این تکنیک، انتظار می رود تا میزان جواب های مبهم کمتر و resolution بالاتری نسبت به سایر روش های هم تراز خود داشته باشد. تعداد پروب های استفاده شده در هر دوروش در جدول ۱آمده است.

بحث

استفاده از روش های متفاوت و مقایسه آن ها برای انجام تایپینگ HLA به دفعات صورت گرفته است.

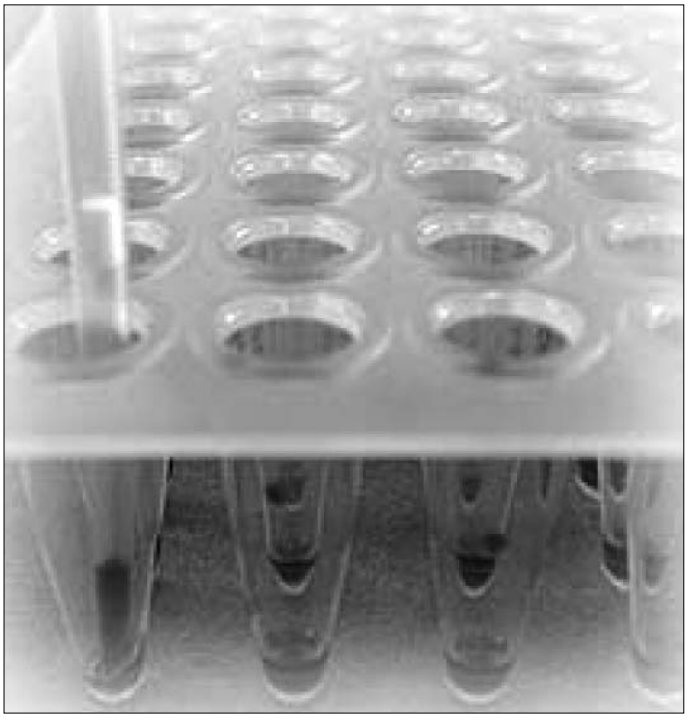
در مقایسه سه تکنیک PCR RFLP, SSP, SSO از ۲۰۰ نمونه داوطلب پیوند مغز استخوان که بر روی لوکوس DRB۱ صورت گرفت (F.Jordan, ۲۰۰۸) روش RFLP به دلایل ایجاد قطعات مشابه در آلل های DQB DRB, DQA, ، وابستگی نتایج DQA, DQB به ژنوتایپ های DRB و سراخر مشابهت قطعه DR۸ با پلی مورفیسم جدیدی از DRV، در ۲۱ مورد از نمونه ها، با دیگر نتایج مغایرت داشت. تکنیک های SSP و SSO همگون با یکدیگر ولی متفاوت در سرعت گزارش شد.[۸]

در گزارشی (Klara Dalva, ۲۰۰۷) از روش نواری به عنوان تکنیکی مطرح شد که میتوان با سه متد ردیابی و حصول نتایج متفاوت در این تکنیک بهره برد. روش های colorimetric با اتصال (streptavidin-biotin)، رنگ های fluorescence مانند (FITC, PE) و همچنین استفاده از X-ray-(digoxigenin-CSPD) در روش نواری، مشروط به وجود دستگاه های مربوطه به هر روش جهت آنالیز نتایج آنها قابل استفاده هستند.[۹]

۲۰۰ نمونه مورد آنالیز قرار گرفته به روش RealTime PCR با کمک ۳ رنگ FAM, VIC, TET بر روی لوکوس DRB۱، نتایج قابل قبولی را ارائه داد (Casamitjana N, ۲۰۰۵) مضافا آنکه از این روش به عنوان تکنیکی با سرعت بالا به همراه نتایج مبهم کمتر نام برده شد. در این گزارش از ۱۶ مخلوط واکنش استفاده شد که گلیسرآلدئیدفسفات دهیدروژناز نیز به عنوان کنترل داخلی بکار برده شده بود.[۱۱]

نتیجه گیری

روش لکه ای و دستگاه تمام اتوماتیک آن، برای مراکزی با حجم نمونه بالا، بسیار مناسب به نظر



می رسد. این در حالی است که روش نواری به دلیل قابلیت انجام تست های تشخیصی دیگر از جمله تست های عفونی برای مراکزی با حجم نمونه کمتر ولی با تنوع زیادتر توصیه می شود.

مراجع

[1]Sharon D. Adams, Peter Krausa, Malcolm McGinnis, Toni B. Simonis, Jason Stein and Francesco M. Marincola. Practicality og High Troughput HLA Sequence-Based Typing. ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) quarterly, 25(2), 2001.

[2]Sharon D. Adams, Kathleen C. Barracchini, Deborah Chen, FuMeei Robbins, David Stroncek and Francesco M. Marincola. Ambiguous allele combinations in sequence-based Typing. ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) quarterly, fourth quarter 2003.

[3]Emeline Masson, Pascale Loiseau, Christine Declerk, Estelle Galup, Christian Freier, Dominique Charron. HLA molecular typing using a new miniaturized and automated SSO assay. Tissue Antigens 77, 370-513. 2011

[4]BAG Health Care GmbH. Instructions for use HISTO SPOT SSO Kits. www.bag-healthcare.com, Version 5/2012.

[5]BAG Health Care GmbH. Instructions for use MR. SPOT. www.bag-healthcare.com, 5/2011.

[6]INNOGENETICS. Instructions for use INNO-LiPA Kits. Rev4. www.innogenetics.com, 2005.

[7]INNOGENETICS. Instructions for use auto-LiPA48 instrument. . www.innogenetics.com, 2005.

[8]F. Jordan, A. J. McWhinnie, S. Turner, N. Gavira, A. A. Calvert, S. A. Cleaver, R. H. Holman, J. M. Goldman, J. A. Madrigal. Comparison of HLA-DRB1 typing by DNA-RFLP, PCR-SSO and PCR-SSP methods and their application in providing matched unrelated donors for bone marrow transplantation. Tissue Antigens, Volume 45, Issue 2, 2008.

[9]Klara Dalva, Meral Beksac. HLA Typing with Sequence-Specific Oligonucleotide Primed PCR (PCR-SSO) and Use of the Luminex Technology. Bone Marrow and Stem Cell Transplantation. pp 61-69. 2007

[10]Chee RE. Histocompatibility testing. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2002;33 Suppl 2:112-4.

[11]Casamitjana N, Faner R, Santamaria A, Colobran R, Ribera A, Pujol-Borrell R, Juan M, Palou E. Development of a new HLA-DRB real-time PCR typing method. Hum Immunol. 2005 Jan;66(1):85-91.

[12]Flexner C. HLA B57 and abacavir hypersensitivity. Hopkins HIV Rep. 2002 May;14(3):5.