مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

DOI: 10.22100/jkh.v18i2.3048

مقاله پژوهشی

راه‌اندازی پانل تشخیصی سنجش بار ویروسی و وضعیت فیزیکی ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ به روش Multiplex Real-Time PCR

شادی ستایشی[۱]، یوسف یحیی‌پور[۲]، حسین قربانی[۳]، فهیمه نخستین[۴]، مقداد باقری[۱]، فرزین صادقی[۵*]

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، گروه میکروب‌شناسی و بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بابل، ایران.
۲- استاد ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بابل، ایران.
۳- استادیار آسیب‌شناسی، گروه آسیب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بابل، ایران.
۴- استادیار زنان و زایمان، گروه گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، ایران.
۵- دانشیار ویروس‌شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی بابل، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۳۰، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۱۲/۱۴

چکیده

مقدمه: *افزایش بار ویروسی در زنان با عفونت مزمن ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ (Human Papilloma Virus 16) و الحاق ژنوم ویروس در کروموزم سلولی با افزایش شیوع ضایعات پیش بدخیم/بدخیم در دهانه رحم مرتبط است. در این مطالعه مراحل راه‌اندازی پانل تشخیصی سنجش بار ویروسی و وضعیت فیزیکی ژنوم HPV16 بر روش Multiplex Real-Time PCR تشریح شده است.*

مواد و روش‌ها: *در این پژوهش یک ناحیه محافظت شده از ژن‌های E^6 و E^2 ویروس HPV16 پس از استخراج از رده سلولی CaSki و تکثیر با روش PCR در پلاسمید باکتریایی pJET1.2/blunt cloning vector کلون شده و همراه با پلاسمید نوترکیب حاوی ناحیه محافظت شده از ژن سلولی RnaseP به‌عنوان استاندارد جهت سنجش کمی میزان بار ویروسی به‌صورت کپی در هر سلول و در نهایت تعیین وضعیت فیزیکی ژنوم ویروس با روش Multiplex Real-Time PCR مورد استفاده قرار گرفت.*

نتایج: *در نتایج Real Time PCR شاخص‌های اختصاصیت، ضریب R_2، شیب و کارایی در محدوده معیارهای پذیرش قرار داشته که نشان می‌دهد ژن‌های E^2 و E^6 ویروس HPV16 و ژن سلولی RnaseP با خطی بودن خوب شناسایی می‌شوند. نتایج نسبت E^2/E^6 در سلول‌های CaSki در مطالعه حاضر (E^2/E^6 ratio=0.15) بیانگر حضور ترکیبی از ژنوم‌های اپیزومال و الحاق شده (Mixed) در این رده سلولی بود.*

نتیجه‌گیری: *نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد پانل تشخیصی طراحی شده برای سنجش بار ویروسی و وضعیت فیزیکی ژنوم HPV16 بر روش Multiplex Real-Time PCR از خطی بودن، حساسیت و اختصاصیت مناسبی مطابق معیارهای پذیرش از پیش تعیین شده برخوردار بود.*

واژه‌های کلیدی: ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶، بار ویروسی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی، کلونینگ مولکولی.

[*] **نویسنده مسئول:** مازندران، بابل، خیابان گنج افروز، دانشگاه علوم پزشکی بابل، **تلفن:** ۰۹۱۹۰۲۱۳۹۶۹، **نمابر:** ۳۲۱۹۰۱۸۱-۰۱۱، **Email:** sadeghifarzin6@gmail.com

ارجاع: ستایشی شادی، یحیی‌پور یوسف، قربانی حسین، نخستین فهیمه، باقری مقداد، صادقی فرزین. راه‌اندازی پانل تشخیصی سنجش بار ویروسی و وضعیت فیزیکی ژنوم ویروس پاپیلومای انسانی تیپ ۱۶ به روش Multiplex Real-Time PCR. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۲؛۱۸(۲):۱۹-۹.

مقدمه

سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع زنان است (۱)، اما در آمار مربوطبه منطقه جغرافیایی ایران، شایعترین بدخیمی دستگاه تناسلی زنان به شمار می‌رود (۲). سرطان دهانه رحم نوعی بدخیمی است که از گردن رحم آغاز می‌گردد. این بیماری به‌دلیل رشد غیرطبیعی سلول‌های اپیتلیالی پوشاننده‌ی سطح داخلی رحم ایجاد می‌شود.عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) مهمترین عامل مسبب سرطان دهانه رحم محسوب می‌شود. تاکنون بیش از ۱۷۰ نوع HPV شناخته شده است. بیش از ۴۰ نوع HPV از طریق تماس جنسی منتقل می‌شوند (۳). ویروس‌های پاپیلومای انسانی سلول‌های بازال اپیتلیوم سنگفرشی چندلایه‌ی سرویکس را هدف قرار می‌دهند.در این بین دو ژنوتایپ پر خطر HPV16 و HPV-18 ٪۷۰ موارد ابتلا را شامل می‌گردند (۱ و ۴). این ژنوتایپ‌ها با انتقال و بقا در سلول‌های اپیتلیال سنگفرشی، خطر نئوپلازی را در لایه‌های اپیتلیوم پوشاننده‌ی مجاری تناسلی افزایش می‌دهند (۵ و ۶). در تمام مناطق جهان، HPV16 شایع‌ترین تیپ پرخطر شناسایی شده در سرطان دهانه رحم می‌باشد؛ به‌طوری‌که حدوداً در ۵۰ درصد از موارد سرطان دهانه رحم ردیابی می‌شود (۷). با این وجود اکثر عفونت‌هایHPV16 به‌طور خود به خودی بهبودیافته و تنها موارد اندکی به سمت بدخیمی پیشرفت می‌کنند. به همین دلیل تصور می‌شود، عوامل دیگری اعم از فاکتورهای میزبانی و فاکتورهای ویروسی در سرطان‌زایی HPV16 نقش داشته باشند. از فاکتورهای ویروسی موردتوجه، بار ویروسی و وضعیت فیزیکی ژنوم (اپیزومال یا الحاق شده) است. اخیراً مطالعات نشان دادند که افزایش در بار ویروسی HPV16 با افزایش خطر پیشروی به سرطان دهانه رحم مرتبط است (۸). همچنین افزایش بار ویروسی در زنان با عفونت مزمن HPV16، با افزایش شیوع ضایعات پیش بدخیم/بدخیم در دهانه رحم مرتبط است (۹). از طرفی یکی از وقایع مهم عفونت HPV16 که در بروز سرطان نیز نقش مهمی ایفا می‌کند، الحاق ژنوم ویروس به داخل کروموزوم سلولی است. الحاق ژنوم ویروس به داخل کروموزوم سلولی که در اثر نوترکیبی هومولوگ رخ می‌دهد، یک مرحله‌ی کلیدی برای افزایش بیان آنکوژن‌های ویروسی E^6 و E^7 می‌باشد و با شدت ضایعات ارتباط مستقیم دارد (۱۰). الحاق ژنومی تقریباً در تمامی تومورها و رده‌های سلولی آلوده با HPV-18 رخ می‌دهد، در حالی‌که در مورد HPV16 این میزان کمتر بوده و حالت اپی زومال ژنوم در تومورهای وابسته‌به این تیپ نیز مشاهده می‌شود (۱۱). الحاق ژنوم ویروس در کروموزم سلولی منجر به حذف ژن E^2 از ژنوم ویروس و متعاقب آن افزایش بیان آنکوژن‌های E^6 و E^7 می‌گردد. اخیراً نسبت بار ویروسی ژن E^2 به E^6 در HPV 16 به‌عنوان معیاری برای تعیین وضعیت فیزیکی ژنوم ویروس (اپیزومال یا الحاق شده) مطرح شده است. اگر نسبت بار ویروسی ژن E^2 به E^6 بیشتر از ۰/۹ باشد نشان‌دهنده وضعیت اپیزومی بوده (پیش‌آگاهی خوب)، در حالی‌که اگر این نسبت بین ۰/۰۰۱ تا ۰/۹ باشد بیانگر حضور ترکیبی از ژنوم‌های اپیزومال و الحاق شده است. با میل این مقادیر به سمت صفر، وضعیت فیزیکی ژنوم ویروس به الحاق شده تغییریافته که نشانگر پیش‌آگهی بد در این بیماران می‌باشد (۱۲). از این رو سنجش دقیق بار ویروسی HPV 16 و تشخیص وضعیت فیزیکی ژنوم در بالین از اهمیت زیادی برخوردار است. در این مطالعه مراحل راه‌اندازی پانل تشخیصی سنجش بار ویروسی و وضعیت فیزیکی ژنوم HPV16 بر روش Multiplex Real-Time PCR تشریح شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع بنیادی-کاربردی بوده و با کد اخلاق IR.MUBABOL.HRI.REC.1398.305 در محل گروه میکروب شناسی و بیوتکنولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل انجام گرفت.

در این پژوهش از رده سلولی CaSki (CRL-1550™) به‌عنوان کنترل مثبت HPV16 استفاده شده است. منشأ این سلول‌ها، کارسینوم سرویکس می‌باشد. این سلول‌ها دارای ژنوم HPV16 هستند و هر سلول دارای حدود ۴۰۰ تا ۶۰۰ کپی از ژنوم HPV16 می‌باشد. رده سلولی موردنظر از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) در فلاسک T25 تهیه شد. این سلول‌ها در محل آزمایشگاه کشت سلول گروه میکروب‌شناسی و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل تحویل گرفته شده و بلافاصله پس از تعویض محیط کشت با Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640 (GIBCO)) به اضافه ۱۰٪ Fetal Bovine Serum (FBS(GIBCO)) و ۱٪ Penicillin-Streptomycin(GIBCO) به مدت کمتر از ۲۴ ساعتدر انکوباتور ۵٪ CO۲، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. با توجه به سرعت رشد سلول‌ها و رسیدن به تراکم سلولی۸۰٪، پس از ۴۸ ساعت سلول‌ها جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند.

برای استخراج DNAاز رده سلولیCaSki از کیت Blood Genomic DNA Extraction Mini Kit و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Favorgen, Taiwan) استفاده شد. به‌طور خلاصه رده سلولی CaSki با تراکم سلولی ۸۰٪، پس از دو بار شستشو با Phosphate-buffered saline (PBS(GIBCO)) ۵ml، با ۵۰۰µl

Trypsin-EDTA(GIBCO) از بستر فلاسک جدا شده و با روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو، شمارش شد. استخراج DNA بر روی رسوب سلولی حاوی ۳×۱۰^{۶} سلول انجام شد (۱۳).

برای به‌دست آوردن خلوص بالایی از DNA ژن‌های E2 وE6 از روش PCR استفاده گردید. واکنش PCR با آنزیم mi-Pfu DNA Polymerase (Metabion) که آنزیم اختصاصی جهت فرآیندهای پایین دستی کلونینگ می‌باشد و با پرایمرهای اختصاصی طراح شده توسط تیم پژوهشی و با حجم نهایی میکس برابر ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت (جدول ۱). ترکیب اجزا به‌کار رفته در واکنش PCR و برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن‌های E2 و E6 به‌ترتیب در جدول ۲ و جدول ۳ نمایش داده شده است. پس از اتمام واکنش، محصولات PCR برروی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند. پس از الکتروفورز قطعات حاصل از تکثیر DNA ژن‌های E^2 و E^6 با رنگ Safe stain و با به‌کارگیری اشعه ماوراء بنفش مشاهده شدند (۱۴).

جدول ۱- پرایمرهای به‌کار رفته برای تکثیر ژن‌های E^2 و E^6

ژن هدف	نام پرایمر	توالی
HPV16 E2	E2 Forward	5`- CAGTAACTGTGGTAGAGGGTCA -3`
	E2 Reverse	5`-CGTCCTTTGTGTGAGCTGTT -3`
HPV16 E6	E6 Forward	5`- CGAAACCGGTTAGTATAAAAGCA -3`
	E6 Reverse	5`- GCTGGGTTTCTCTACGTGTTC -3`

جدول ۲- ترکیب اجزا به‌کار رفته در واکنش PCR برای ژن‌های E^2 و E^6

۱۰X Reaction Buffer with MgCl	۵ µl
dNTP Mix (۲/۵mM each)	۴µl
Forward Primer ۱۰ pmol/µl	۲µl
Reverse Primer ۱۰ pmol/µl	۲µl
mi-Pfu DNA Polymerase (۲/۵u/µl)	۰/۵µl
Template DNA	۱۰۰ng
PCR Grade H_2O	Fill up to ۵۰ µl
۱۰X Reaction Buffer with MgCl	۵ µl

جدول ۳- برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن‌های E^2 و E^6

نام مرحله	دما	تعداد سیکل	زمان
Initial Denaturation	۹۵°C	۱	۲min/cycle
Denaturation	۹۵°C	۳۰	۲۰sec/cycle
Annealing	۵۳/۷°C	۳۰	۳۰sec/cycle
Extension	۷۳°C	۳۰	۲min/cycle
Final Extension	۷۳°C	۱	۵min/cycle

از آنجایی‌که پرایمرها و پرایمر دایمرهای موجود در محصول PCR در مراحل کلونینگ ایجاد تداخل می‌کنند، محصولات PCR ژن‌های E^2 و E^6 باید قبل از کلونیگ به نحوه مؤثری خالص گردد. به این منظور از کیت تخلیص محصول PCR به نام ExpinTM PCR SV kit (Gene All, Korea) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد این کیت قادر به حذف قطعات کمتر از ۱۰۰bp می‌باشد.

محصول PCR تخلیص شده مربوطبه ناحیه E^2 و E^6 ویروس HPV16 با روش Blunt End Cloning و با استفاده از کیت CloneJET™ PCR Cloning Kit طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Thermo Scientific, USA) در وکتور pJET1.2/blunt vector کلون شدند. مراحل کلونینگ به‌طور خلاصه شامل واکنش الحاق (Ligation) با نسبت ۳ به ۱ محصول PCR به وکتور، طبق پروتکل کیت، تهیه باکتری مستعد E.coli DH5α (Competent) تهیه شده از از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) با استفاده از محلول کلرید کلسیم ۰/۱ مولار و ترانسفرم کردن باکتری‌ها با روش شوک حرارتی می‌باشد (۱۵). وکتور pJET1.2/blunt حاوی یک ژن کشنده بوده و در نتیجه الحاق صحیح محصول PCR در محل کلونینگ، خاصیت کشندگی خود را از دست می‌دهد. از این رو فقط باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب قادر به تکثیر بوده و کلنی تشکیل می‌دهند و دیگر نیازی به انجام غربالگری آبی–سفید نمی‌باشد. برای تأیید وجود قطعه موردنظر در وکتور، واکنش PCR مستقیم از کلنی‌های رشد کرده انجام شد که ترکیب اجزاء به‌کار رفته در واکنش کلونی PCRو برنامه مورد استفاده در ترموسایکلر مطابق جداول ۱ تا ۳ می‌باشد.

از کلنی نمونه‌های دارای کمترین اسمیر و شارپ‌ترین باند برای هر ژن در محیط کشت LB Broth حاوی آمپی‌سیلین به‌صورت Overnight کشت داده شد و در نهایت از کلنی‌های به‌دست آمده استخراج پلاسمید با استفاده از کیت GeneAll® ExprepTM Plasmid SV mini طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. غلظت و کیفیت DNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ سنجیده شده و پس از تأیید کیفیت و غلظت مطلوب جهت تعیین توالی به روش Sanger به شرکت Pishgam Biotech ارسال گردید.

برای رسم منحنی استاندارد در آزمایش Real Time PCR باید از نمونه استاندارد (پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن‌های مورد مطالعه) رقت سریالی تهیه کرده و برای تمامی رقت‌ها واکنش Real Time PCR انجام شود. در این تحقیق از پلاسمید نوترکیب حاوی ناحیه محافظت شده از ژن سلولی RnaseP و پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ناحیه E^2 و E^6 ویروس HPV16 استفاده شد. پلاسمید نوترکیب حاوی ناحیه محافظت شده از ژن سلولی RnaseP توسط شرکت Shanghai Gene ray Biotech Co., Ltd سنتز و تأیید گردید.

برای تهیه رقت سریالی از پلاسمیدهای نوترکیب، تعداد مولکول‌های پلاسمید نوترکیب در هر میکرولیتر براساس دستورالعمل زیر محاسبه شد. ابتدا وزن مولی پلاسمید نوترکیب با استفاده از حاصل ضرب اندازه توالی پلاسمید به اضافه توالی Insert در وزن متوسط هر جفت باز (۶۶۰ Da) محاسبه گردید. سپس وزن مولکولی پلاسمید نوترکیب با تقسیم وزن مولی به عدد آووگادرو محاسبه شد.

$$\text{Weight in Daltons (g/mol)} = (\text{bp size of plasmid+insert}) \times (660\text{Da}) \quad (۱-۳)$$

$$\frac{\text{(g/mol)}}{\text{(Avogadro's number)}} = \text{g/molecule} \quad (۳-۲)$$

با تعیین غلظت پلاسمید استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (ng/µl) و تقسیم کردن آن بر وزن مولکولی (g/molecule) تعداد نسخه‌های پلاسمید نوترکیب در واحد حجم محاسبه شد.

$$\frac{\text{Concentration of plasmid (g/µl)}}{\text{(g/molecule)}} = \text{molecule / µl} \quad (۳-۳)$$

پس از تهیه رقت سریالی ده برابری از پلاسمید نوترکیب حاوی ناحیه محافظت شده از ژن سلولی RnaseP واکنش Real Time PCR بر روی رقت‌های پلاسمید نوترکیب با پرایمرهای اختصاصی شرکت تولیدکننده و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت (جدول ۴). ترکیب اجزا به‌کار رفته در واکنش Real Time PCR و برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژنRnaseP به‌ترتیب در جدول ۵ و جدول ۶ نمایش داده شده است. در نهایت منحنی استاندارد با استفاده از رقت‌های پلاسمیدی فوق رسم گردید (۱۶).

جدول ٤- توالی پرایمرها و پروب مورد استفاده در واکنشReal Time PCR کمی برای ژن سلولی Rnase P

Sequences (۵'-۳')	نام پرایمر و پروب	ژن هدف
5'- ATGGCGGTGTTTGCAGATTT -3'	RNP-F	Human RnaseP
5'- TGTCTCCACAAGTCCGCG -3'	RNP-R	
FAM- GGTTCTGACCTGAAGGCTCT - BHQ1	RNP-P	

جدول ۵- ترکیب اجزاء به‌کار رفته در واکنش Real Time PCR کمی ژن RnaseP

حجم	مواد
۱۲/۵ µl	Taq Man Master Mix 2X
۱/۲ µl	Primers & Probe Mix(100pmol/ µl)
۶/۳ µl	Nuclease Free Water
ng≈۱۰۰	DNA template
۲۵ µl	Total Volume

جدول ٦- برنامه مورد استفاده در دستگاه Real Time PCR جهت سنجش کمی ژن سلولی RnaseP

تکرار	زمان	دما (C°)	مراحل
۱	۵ دقیقه	۹۵	Initial Denaturation
۴۰	۱۵ ثانیه	۹۵	Denaturation Annealing/ Extension
	۳۰ ثانیه	۶۰	
	ثانیه		

پس از تهیه رقت سریالی ده برابری از پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن‌های E^2 و E^6 ویروسHPV16 واکنش Real Time PCR به‌صورت مالتی پلکس بر روی رقت‌های پلاسمیدهای نوترکیب با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده توسط تیم پژوهشی و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت (جداول ۷ و ۸). ترکیب اجزا به‌کار رفته در واکنش Real Time PCR و برنامه مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر برای تکثیر ژن‌های E^2 و E6 ویروسHPV16 به‌ترتیب در جدول ۹ و جدول ۱۰ نمایش داده شده است. در نهایت منحنی استاندارد برای ژن‌های E^2 و E^6 با استفاده از رقت‌های پلاسمیدی فوق رسم گردید (۱۶).

جدول ۷- پرایمرها و پروب‌های مورد استفاده در واکنش Real Time PCR کمی برای نواحی E^2 و E^6

Sequences (۵'-۳')	نام پرایمر و پروب	ژن هدف
5'- TGAAATTATTAGGCAGCACTTGG -3'	E2 F-Primer	HPV16-E2
5'- GTCTGTGTTTCTTCGGTGCC -3`	E2 R-Primer	
5' HEX- ATACCAAAGCCGTCGCCTT -BHQ13`	E2 Probe	
5'- GACCCAGAAAGTTACCACAGTTA -3'	E6 F-Primer	HPV16-E6
5'- ATTAGAATGTGTGTACTGCAAGC -3``	E6 R-Primer	
5'- FAM- GCACAGAGCTGCAAACAACT -BHQ1-3`	E6 Probe	

جدول ۸- ترکیب اجزاء به‌کار رفته در واکنش Real Time PCR کمی ژن‌های E^2 و E^6 ویروس HPV16

حجم	مواد
۱۲/۵ µl	Taq Man Master Mix 2X
۱/۲ µl	Primers & Probe Mix(100pmol/ µl)
۶/۳ µl	Nuclease Free Water
ng≈۱۰۰	DNA template
۲۵ µl	Total Volume

جدول ۹- برنامه مورد استفاده در دستگاه Real Time PCR جهت سنجش کمی ژن‌های E^2 و E^6 ویروس HPV16

تکرار	زمان	دما(C°)	مراحل
۱	۵ دقیقه	۹۵	Initial Denaturation
۴۰	۱۵ ثانیه	۹۵	Denaturation Annealing/ Extension
	۳۰ ثانیه	۶۰	
	ثانیه		

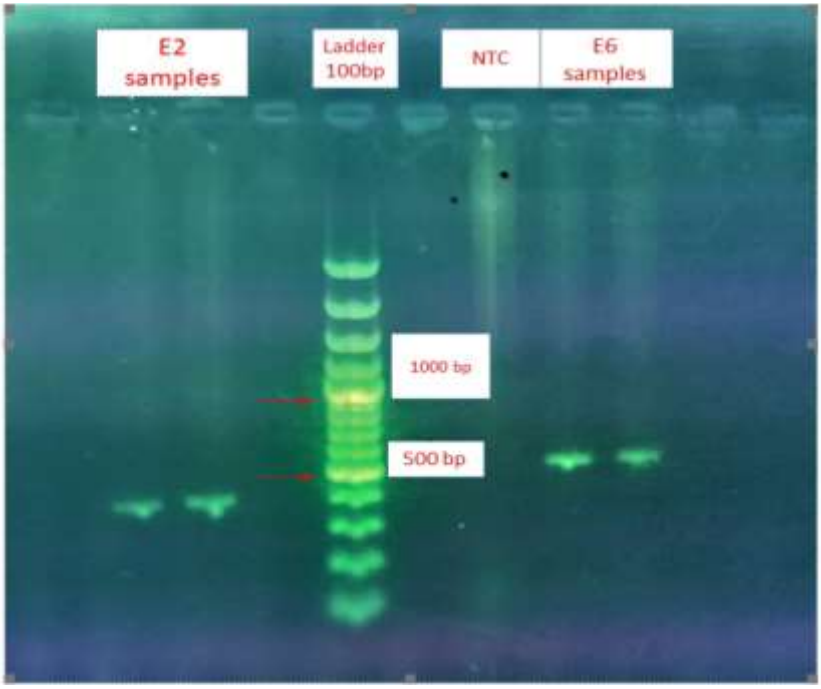
در این مطالعه برای سنجش تعداد کپی ژنوم ویروس در هر سلول، از محاسبه تعداد کپی ژن سلولی RNaseP استفاده شد. ژن کدکننده RnaseP به تعداد یک کپی در هر ژنوم هاپلوئید موجود می‌باشد. این ژن کاندیدای خوبی به‌عنوان کنترل داخلی واکنش PCR بوده و به‌دلیل اینکه تعداد کپی آن در هر سلول دیپلوئید انسانی (۲ کپی) مشخص است برای تعیین کمی تعداد سلول‌ها و تخمین تعداد کپی ژن‌های ویروسی در هر سلول انسانی به‌کار می‌رود. از آنجایی که ژن

سلولی RNaseP در هر سلول دیپلوئید انسانی به تعداد ۲ کپی وجود دارد، با تقسیم کردن تعداد کپی ژنوم ویروس HPV16 در هر میکرولیتر به نصف تعداد کپی ژن RnaseP در هر میکرولیتر، تعداد کپی از ژنوم ویروس HPV16 در هر سلول محاسبه شد.

$$\frac{\text{Viral HPV 16 Copies per µl}}{\text{1/2RNase P Copies per µl}} = \text{VIRAL HPV 16 Copies per Cell}$$

نتایج

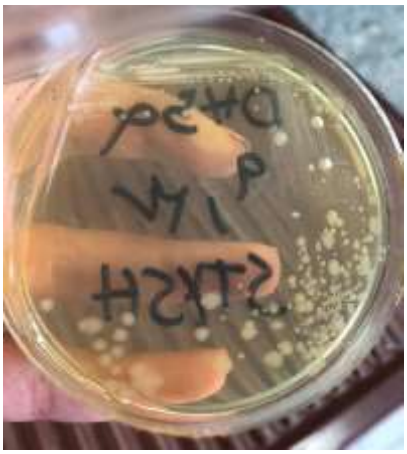
صحت واکنش PCR نواحی حفاظت شده ژن‌های E^2 و E^6 ویروس HPV16 در الکتروفورز محصولات PCR تأیید گردید. باندهای ۳۹۹ و ۵۰۳ جفت بازی در ژل آگارز ۱/۵ درصد مشاهده شد که به‌ترتیب مبین نواحی E^2 و E^6 ویروس می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- نمای الکتروفورز محصولات PCR نواحی حفاظت شده ژن‌های E2 و E6 در ژل آگارز ۱/۵ درصد

پس از کلونینگ محصول PCR تخلیص شده نواحی E^2 و E^6 ویروس HPV16 در باکتری‌های E.coli DH5α، کلنی باکتری‌های نوترکیب جداسازی گردید (شکل ۲). جهت تأیید نتایج حاصل از کلونینگ، کلنی‌های مقاوم به آمپی‌سیلین با آزمون کلنی PCR مورد بررسی قرار گرفتند. کلنی‌های حاوی ژن E^6 ویروس دارای باند ۵۰۳ جفت بازی و کلنی‌های حاوی ژن E^2 دارای باند ۳۹۹ جفت بازی در ژل آگارز ۱/۵ درصد بودند (شکل ۳). در نهایت تأیید نهایی کلونینگ با توالی‌یابی پلاسمیدهای نوترکیب صورت گرفت (شکل ۴).

اختصاصیت آزمایش Real-Time PCR حاضر ابتدا به‌صورت in silico با یافتن نواحی دارای تشابه بین پرایمر و پروب‌ها با استفاده از پایگاه BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) تعیین شد. نتایج تجزیه و تحلیل BLAST نشان داد که هر جفت پرایمر و پروب به‌طور اختصاصی ژن‌های E^2 و E^6 ویروسHPV16 را بدون هیچ گونه واکنش متقاطع با سایر ژنوتایپ‌های HPV یا سایر پاتوژن‌ها هدف قرار می‌دهند. همچنین اختصاصیت آزمایش با نمونه‌هایی که با روش مرجع جایگزین (Line probe assay) منفی شناخته می‌شدند تأیید شد. این نمونه‌های منفی هیچ سیگنال مثبتی در آزمایش Real-Time PCR ایجاد نکردند.

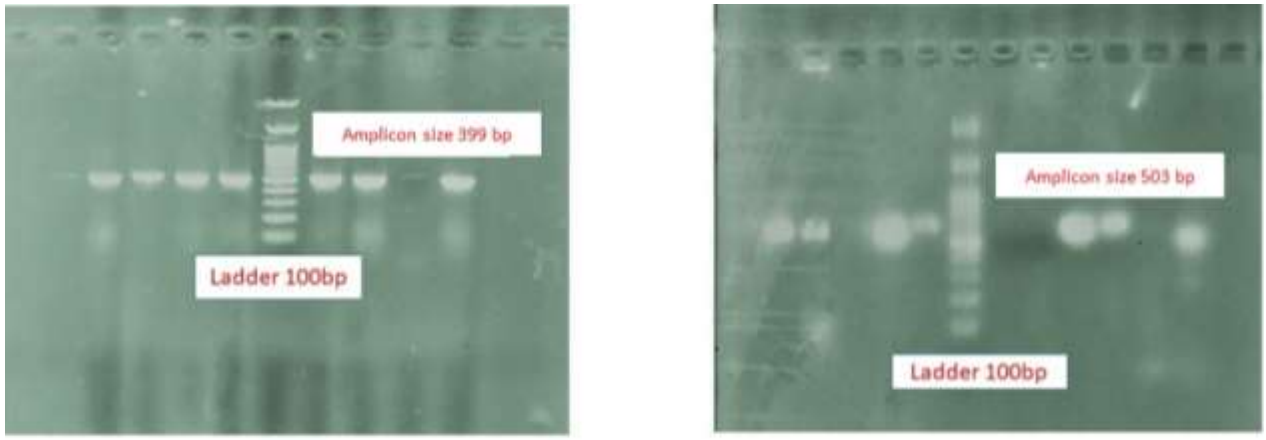


شکل ۲- نمای کلنی باکتری‌های حاوی پلاسمید نوترکیب ناحیه E^2 و E^6

خطی بودن (Linearity) آزمایش Real-Time PCR به‌صورت تجربی با آزمایش رقت سریالی ده برابری پلاسمیدهای نوترکیب

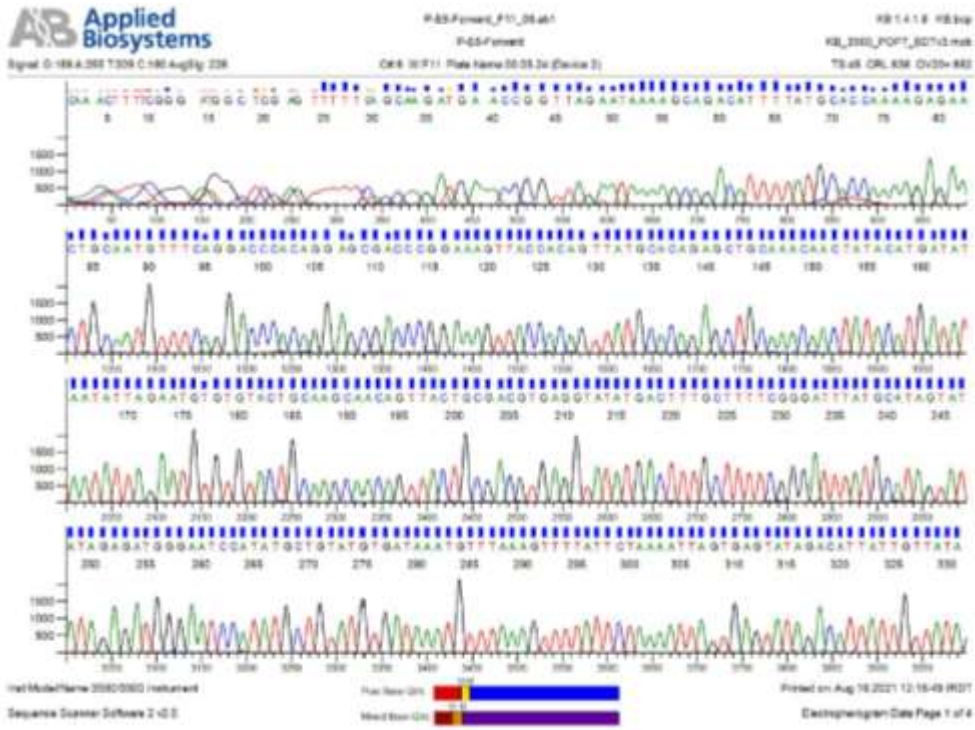
حاوی ژن‌های E^2 و E^6 ویروس HPV16 و ژن سلولی RnaseP تعیین شد. سپس یک تحلیل رگرسیونی بر روی داده‌ها برای محاسبه ضریب R^2، شیب (Slope) و کارآیی (Efficiency) لازم برای تعیین برازش رگرسیون خطی در مقایسه با معیارهای پذیرش از پیش تعیین شده انجام شد (جدول ۱۰). نتایج نشان داد که تمامی شاخص‌های رگرسیون در معیارهای پذیرش قرار دارند که نشان می‌دهد ژن‌های E^2 و E^6 ویروس HPV16 و ژن سلولیRnaseP با خطی بودن خوب شناسایی می‌شوند (اشکال ۵ تا ۷).

در این مطالعه جهت بررسی صحت سنجش وضعیت فیزیکی ژنومHPV16 با روش Real-Time PCR تعداد کپی ژن‌های E^2 و E^6 ویروس HPV16 و ژن سلولیRnaseP در ژنوم استخراج شده از رده سلولی CaSki (رده سلولی کنترل مثبت HPV16) تعیین شد و نسبت E^2/E^6 (E^2/E^6 ratio) محاسبه گردید. نتایج نشان داد در سلول‌های CaSki نسبت E^2/E^6 برابر ۰/۱۵ است که بیانگر حضور ترکیبی از ژنوم‌های اپیزومال و الحاق شده (Mixed) است.

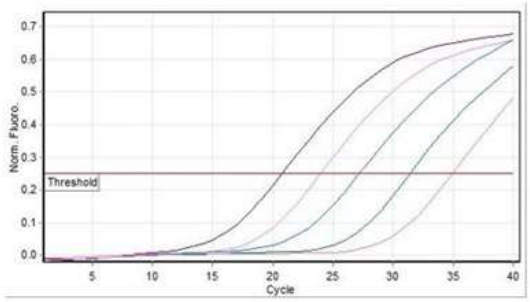


b a

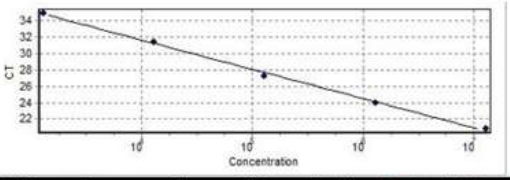
شکل ۳- نمای الکتروفورز محصولات کلنی PCR از نمونه‌های کلنی باکتری حاوی ژن E^6 (a و E^2 (b



شکل ٤- نمای الکتروگرام تعیین توالی پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن‌های E^2 و E^6 با پرایمرهای forward/reverse 2/1 pJET



Standard Curve



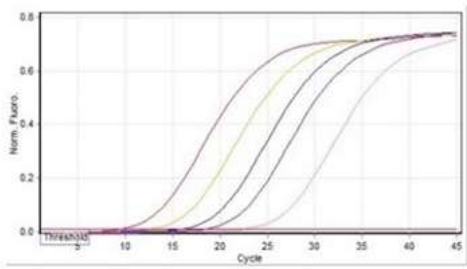
RNase-P	
R^2 Value	0.994
Slope	-3.629
Reaction efficiency	0.88

No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (copies/ul)	Calc Conc (copies/ul)
4		S4	Standard	20.80		13,000,000.0	10,954,640.4
5		S5	Standard	23.99		1,300,000.0	1,390,922.3
6		S6	Standard	27.21		130,000.0	174,701.4
7		S7	Standard	31.41		13,000.0	11,655.7
8		S8	Standard	34.93		1,300.0	1,196.7

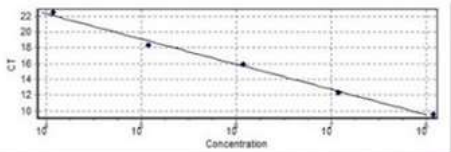
This report was generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.3.5 (Build 1).
Copyright ©2013 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.

شکل ٥- نتایج حاصل از آزمایش Real Time PCR بر روی رقت سریالی ده برابری نمونه استاندارد (پلاسمید نوترکیب حاوی ناحیه محافظت شده ژن سلولیRnase P) و رسم منحنی استاندارد

Quantitation data for Cycling A.Yellow



Standard Curve

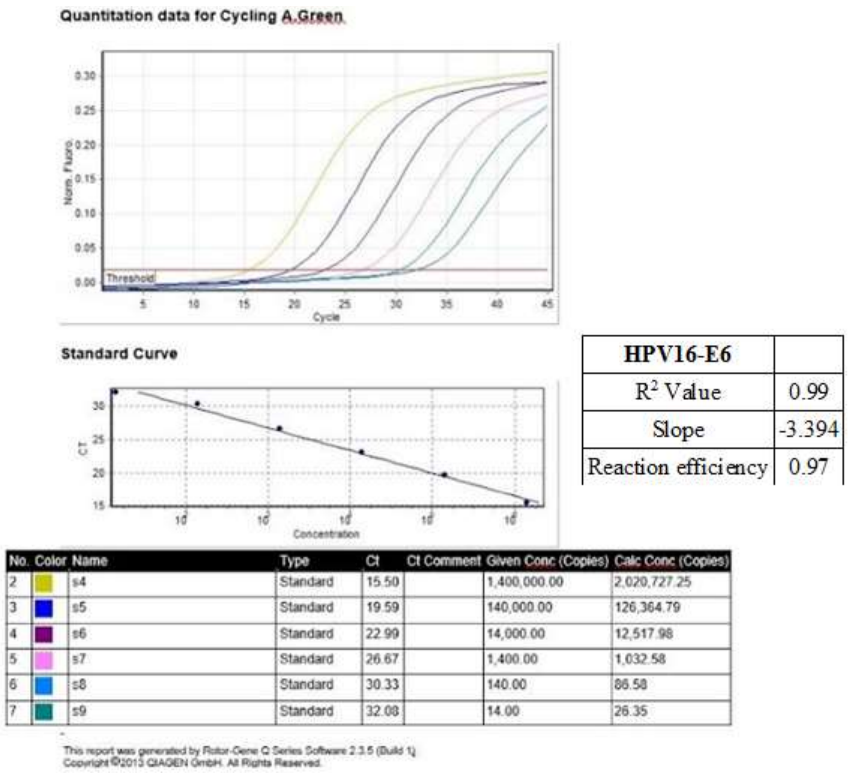


HPV16-E2	
R^2 Value	0.993
Slope	-3.171
Reaction efficiency	1.066

No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)
1		s2	Standard	9.52		120,000,000.0	103,575,032.6
2		s3	Standard	12.29		12,000,000.0	13,877,238.2
3		s4	Standard	15.65		1,200,000.0	1,043,045.4
4		s5	Standard	18.23		120,000.0	185,044.7
5		s6	Standard	22.40		12,000.0	8,969.5

This report was generated by Rotor-Gene Q Series Software 2.3.5 (Build 1).
Copyright ©2013 QIAGEN GmbH. All Rights Reserved.

شکل ٦- نتایج حاصل ازآزمایش Real Time PCR بر روی رقت سریالی ده برابری نمونه استاندارد (پلاسمید نوترکیب حاوی ناحیه محافظت شده ژن E^2 ویروس HPV-16 و رسم منحنی استاندارد



شکل ۷- نتایج حاصل از آزمایش Real Time PCR بر روی رقت سریالی ده برابری نمونه استاندارد (پلاسمید نوترکیب حاوی ناحیه محافظت شده ژن E^6 ویروس HPV16 و رسم منحنی استاندارد

جدول ۱۰- معیارهای پذیرش برای تحلیل خطی آزمایش Real Time PCR

معیارهای پذیرش از پیش تعیین شده	شاخص
$۰/۹۷ \leq x \leq ۱/۰$	R^2
$-۳/۹ \leq x \leq -۲/۹$	Slope
$۸۰ \leq x \leq ۱۲۰$	Efficiency (%)

بحث

در این مطالعه رده سلولی CaSki به‌عنوان کنترل مثبت و الگوی PCR جهت تکثیر نواحی E^2 و E^6 ژنوم ویروس HPV16 مورد استفاده قرار گرفت. پس از تأیید محصول PCR و خالص‌سازی، نواحی حفاظت شده E^2 و E^6 در pJET1.2/blunt cloning vector کلون شدند. در اولین گام برای ساخت وکتور نوترکیب ابتدا نواحی ژن ویروسی موردنظر با آنزیم Taq DNA پلیمراز تکثیر شده و سپس با پروتوکل نواحی چسبنده جهت اتصال به وکتور فوق الذکر مورد استفاده قرار گرفتند. پس از بررسی نتیجه اتصال، نواحی ویروسی مورد نظر به وکتور کلونینگ اتصال نیافته بود. به همین جهت از آنزیم DNA پلی‌مراز با صحت بالا mi-pfu استفاده گردید و با پروتکل انتهای صاف اتصال ژن خارجی به پلاسمید با موفقیت انجام گرفت. به‌طور موازی رده باکتریایی E.coli DH5α جهت مستعدسازی کشت داده شده و با روش کلرید کلسیم آماده دریافت وکتورهای نوترکیب شد. ابتدا از گرانول‌های کلرید کلسیم جهت مستعدسازی استفاده شد که در این روش جمعیتی از باکتری‌ها از دست رفته و در انتهای میکروتیوب تشکیل رسوب دادند. برای رفع این مانع از پودر کلرید کلسیم آب پوشیده استفاده گردید. از دیگر چالش‌های کار با این رده باکتریایی کم بودن قابلیت دریافت پلاسمید در بعضی سویه‌ها بود که با استفاده موازی از سویه‌های مختلف بهترین سویه برای استفاده مد نظر قرار گرفت. آزمون کلنی PCR جهت تأیید کلنی‌های به‌دست آمده در هر پلیت برای ژن‌های E^2 و E^6 انجام شد. بر اساس پرایمرهای طراحی شده، باندهای موردنظر برای ژن‌های E2 با ۴۰۰ جفت باز و E^6 با ۶۰۰ جفت باز مشاهده گردید. در الکتروفورز محصول کلنی PCR ژن E^6 دو نوع باند در اندازه ۵۰۰ جفت باز و کمی بالاتر از ۵۰۰ جفت باز مشاهده گردید. از آنجایی که HPV16 می‌تواند به‌صورت واریانت وجود داشته باشد، ممکن است این تفاوت به‌دلیل وجود واریانت‌های مختلف HPV16 در ناحیه E^6 باشد (۱۷ و ۱۸). نمونه پلاسمیدهای نوترکیب به‌دست آمده برای هر دو ژن E^2 و E^6 تعیین توالی شد. در بررسی نتایج حاصله با ابزار NCBI Mega BLAST صحت پلاسمیدهای کلون شده تأیید گردید.

در مطالعات گذشته، مقادیر بار ویروسی در بررسی ژن‌های E^2 و E^6 پاپیلوما ویروس انسانی تایپ ۱۶ به‌عنوان شاخصی برای پیش‌بینی

پیشروی سرطان دهانه رحم مطرح شده است (۸ و ۱۹ و ۲۰). در یکی از مطالعات از یک پلاسمید حاوی ژنوم HPV16برای اندازه‌گیری بار ویروسی استفاده شده و براساس وجود یا عدم‌وجود مقادیر بار ویروسی در بررسی ژن E^2، مقدار بار ویروسی در بررسی ژن E^6 با روش Multiplex Real Time PCRبا پروب Taqman محاسبه گردیده است (۸). در دیگر تحقیق صورت گرفته، از دو پلاسمید یکی حاوی ژنوم HPV16 و دیگری تنها حاوی ژن E^6 استفاده شده و مقادیر بار ویروسی در بررسی ژن‌های E^2 و E^6 با روش SYBR Green Real-Time PCR و به‌طور جداگانه برای هر ژن اندازه‌گیری شده است (۹). یکی از نقاط ضعف دو مطالعه فوق، محاسبه بار ویروسی به‌صورت غیرطبیعی یا Non-Normalized می‌باشد، به‌طوری‌که بار ویروسی نسبت‌به تعداد سلول‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری نشده، که تحلیل بار ویروسی را برای پیش‌بینی میزان پیشروی بیماری دشوار می‌کند. از طرفی استفاده از روش SYBR Green به‌دلیل تکثیر غیراختصاصی و وجود سیگنال‌های فلورسنت ناشی از تکثیر پرایمر–دایمر روشی مناسب برای تعیین بار ویروسی نمی‌باشد. در بررسی صورت گرفته توسط Saunier و همکاران (۲۱) بار ویروسی براساس تعداد کپی ژن‌های E^2 و E^6 و طبیعی کردن این مقادیر با ژن آلبومین با روش Multiplex Real Time PCR و پروب Taqman صورت گرفته است. از آنجایی که ژن آلبومین می‌تواند دارایpseudogene باشد، استفاده از این ژن برای نرمال کردن بار ویروسی به‌صورت کپی در هر سلول توصیه نمی‌شود و می‌تواند باعث تحلیل نادرست تعداد کپی نرمال شده ژنوم ویروسی گردد. ژن کدکننده RNase-P در انسان یک Single Copy Gene بوده و به تعداد یک کپی در هر ژنوم هاپلوییدموجود می‌باشد. ژن RNase-P، کاندیدای خوبی به‌عنوان کنترل داخلی واکنش PCR بوده و به‌دلیل اینکه تعداد کپی آن در هر سلول دیپلوییدانسانی (۲ کپی) مشخص است، برای تعیین کمی تعداد سلول‌ها در آزمون‌های کمی Real-Time PCR به‌کار می‌رود. شرکت Applied Biosystems یا ABI که یکی از پیشگامان کیت‌های تشخیصی Real-Time PCR در جهان محسوب می‌شود از ژن RNaseP برای طبیعی کردن آزمون‌هایReal Time PCR با روش کمیت سنجی مطلق استفاده می‌کند. یکی از موارد نوآوری مطالعه حاضر نسبت‌به مطالعات گذشته استفاده از ژنRNaseP برای نرمال کردن داده‌های بار ویروسی HPV16 می‌باشد.

از آنجایی که الحاق ژنوم HPV16 در کروموزم سلولی منجر به حذف ژن E^2 از ژنوم ویروس و متعاقب آن افزایش بیان آنکوژن E^6 می‌گردد. اخیراً نسبت بار ویروسی ژن E^2 به E^6 در HPV16 به‌عنوان معیاری برای تعیین وضعیت فیزیکی ژنوم ویروس (اپیزومال، الحاق شده و ترکیبی) مطرح شده است. براساس مطالعات پیشین جهت بررسی وضعیت فیزیکی ژنوم HPV16از اندازه‌گیری نسبت بار ویروسی ژن E^2 به E^6 استفاده می‌گردد. بدین ترتیب که براساس نتایج چندین مطالعه، نمونه‌های با نسبت E^2 به E^6 بین ۰/۰۰۱ تا ۰/۹ دارای وضعیت فیزیکی ترکیب اپیزومال و الحاق شده (Mix)، نمونه‌های با مقادیر E^2/E^6 صفر از نظر فیزیکی دارای وضعیت الحاق شده و مقادیر بزرگتر از ۰/۹نشان‌دهنده وضعیت ژنومی اپیزومال در نظر گرفته شدند (۸، ۹ و ۱۹). نتایج نسبت E^2/E^6 در سلول‌های CaSki در مطالعه حاضر (E2/E6 ratio=0.15) بیانگر حضور ترکیبی از ژنوم‌های اپیزومال و الحاق شده (Mixed) در این رده سلولی می‌باشدکه با نتایج سایر مطالعات همخوانی دارد (۲۲ و ۲۳). این همخوانی نشان‌دهنده صحت سنجش وضعیت فیزیکی ژنوم HPV16 با روش Real-Time PCR در مطالعه حاضر می‌باشد. هرچند خطی بودن، حساسیت و اختصاصیت آزمون Real-Time PCR طراحی شده در این مطالعه در محدوده معیارهای پذیرش از پیش تعیین شده قرار دارد ولی یکی از محدودیت‌های مطالعه حاضر عدم تعیین حساسیت، اختصاصیت و Cut off تشخیصی، آزمون بر روی نمونه‌های بالینی بیماران مبتلا به نئوپلازی داخل اپیتلیالی و کارسینوم سلول‌های سنگفرشی دهانه رحم می‌باشد. از طرفی ارزیابی شاخص‌های بار ویروسی و وضعیت فیزیکی ژنوم با استفاده از این آزمون در بافت‌های پارافینه و تازه بیماران مبتلا به نئوپلازی داخل اپیتلیالی و کارسینوم سلول‌های سنگفرشی دهانه رحم پیشنهاد می‌گردد.

در مجموع نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد پانل تشخیصی طراحی شده برای سنجش بار ویروسی و وضعیت فیزیکی ژنوم HPV16 بر روش Multiplex Real-Time PCR از خطی بودن، حساسیت و اختصاصیت مناسبی مطابق معیارهای پذیرش از پیش تعیین شده برخوردار بوده و ارزیابی پانل تشخیصی مذکور در نمونه‌های بافتی پارافینه و تازه بیماران مبتلا به نئوپلازی داخل اپیتلیالی و کارسینوم سلول‌های سنگفرشی دهانه رحم در مطالعات آتی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از زحمات جناب آقای دکتر داود افشار عضو محترم هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی زنجان و همچنین مدیر گروه و کارکنان گروه میکروب‌شناسی و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل نهایت سپاسگزاری را دارند.

References

1. Lee SJ, Yang A, Wu TC, Hung CF. Immunotherapy for human papillomavirus-associated disease and cervical cancer: review of

2. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Cervical cancer in Iran: integrative insights of epidemiological analysis. Biomedicine (Taipei) 2018;8:18. doi: 10.1051/bmdcn/2018080318

3. Burd EM. Human Papillomavirus and Cervical Cancer.Clin Microbiol Rev 2003;16:1-17. doi: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003

4. Yang X, Cheng Y, Li C. The role of TLRs in cervical cancer with HPV infection: a review. Signal Transduct Target Ther 2017;2:17055. doi: 10.1038/sigtrans.2017.55

5. Szymonowicz KA, Chen J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. Cancer Biol Med 2020;17:864-78. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0370

6. Ye H, Song T, Zeng X, Li L, Hou M, Xi M. Association between genital mycoplasmas infection and human papillomavirus infection, abnormal cervical cytopathology, and cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. Arch Gynecol Obstet 2018;297:1377-87. doi: 10.1007/s00404-018-4733-5

7. Liu C, Mann D, Sinha UK, Kokot NC. The molecular mechanisms of increased radiosensitivity of HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC): an extensive review. J Otolaryngol 2018;47:59. doi: 10.1186/s40463-018-0302-y

8. Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen SJJocm. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. J Clin Microbiol 2002;40:886-91. doi: 10.1128/JCM.40.3.886-891.2002

9. Cricca M M-LA, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, et al. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratioas markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. Gynecol Oncol 2007;106:549-57. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.05.004

10. Oyervides-Muñoz MA, Pérez-Maya AA, Rodríguez-Gutiérrez HF, Gómez-Macias GS, Fajardo-Ramírez OR, Treviño V, et al. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. Infect Genet Evol 2018;61:134-44. doi: 10.1016/j.meegid.2018.03.003

11. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. Future Virol 2011;6:45-57. doi: 10.2217/fvl.10.73

12. Álvarez-Paredes L, Santibañez M, Galiana A, Rodríguez Díaz JC, Parás-Bravo P, Andrada-Becerra ME, et al. Association of Human Papillomavirus Genotype 16 Viral Variant and Viral Load with Cervical High-grade Intraepithelial Lesions. Cancer Prev Res (Phila) 2019;12:547-56. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-18-0397

13. Tran SL, Puhar A, Ngo-Camus M, Ramarao N. Trypan blue dye enters viable cells incubated with the pore-forming toxin HlyII of Bacillus cereus. PLoS One 2011;6:e22876. doi: 10.1371/journal.pone.0022876

14. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. J Vis Exp 2012:e3998. doi: 10.3791/3998

clinical and translational research. J Gynecol Oncol 2016;27:e51. doi: 10.3802/jgo.2016.27.e51

15. Bergmans HE, van Die IM, Hoekstra WP. Transformation in Escherichia coli: stages in the process. J Bacteriol 1981;146:564-70. doi: 10.1128/jb.146.2.564-570.1981

16. Lefevre J, Hankins C, Pourreaux K, Voyer H, Coutlée F. Real-time PCR assays using internal controls for quantitation of HPV-16 and β-globin DNA in cervicovaginal lavages. J Virol Methods 2003;114:135-44. doi: 10.1016/j.jviromet.2003.09.003

17. Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, et al. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. J Clin Microbiol 1991;29:1765-72. doi: 10.1128/jcm.29.9.1765-1772.1991

18. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. J Virol 1997;71:2463-72. doi: 10.1128/jvi.71.3.2463-2472.1997

19. Chang L, He X, Yu G, Wu Y. Effectiveness of HPV 16 viral load and the E2/E6 ratio for the prediction of cervical cancer risk among Chinese women. J Med Virol 2013;85:646-54. doi: 10.1002/jmv.23490

20. Lefevre J, Hankins C, Money D, Rachlis A, Pourreaux K, Coutlée F. Human Papillomavirus Type 16 Viral Load Is Higher in Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Women with High-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Than in Those with Normal Cytology Smears. J Clin Microbiol 2004;42:2212-5. doi: 10.1128/JCM.42.5.2212-2215.2004

21. Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated Human Papillomavirus Type 16 Is Frequently Found in Cervical Cancer Precursors as Demonstrated by a Novel Quantitative Real-Time PCR Technique. J Clin Microbiol 2002;40:886-91. doi: 10.1128/JCM.40.3.886-891.2002

22. Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, et al. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. Gynecologic Oncology 2007;106:5.57-49 doi: 10.1016/j.ygyno.2007.05.004

23. Saunier M, Monnier-Benoit S, Mauny F, Dalstein V, Briolat J, Riethmuller D, et al. Analysis of Human Papillomavirus Type 16 (HPV16) DNA Load and Physical State for Identification of HPV16-Infected Women with High-Grade Lesions or Cervical Carcinoma. J Clin Microbiol 2008;46:3678-85. doi: 10.1128/JCM.01212-08

24. Khanal S, Shumway BS, Zahin M, Redman RA, Strickley JD, Trainor PJ, et al. Viral DNA integration and methylation of human papillomavirus type 16 in high-grade oral epithelial dysplasia and head and neck squamous cell carcinoma. Oncotarget 2018;9. doi: 10.18632/oncotarget.25754

25. Meissner JD. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. J Gen Virol 1999;80:1725-33. doi: 10.1099/0022-1317-80-7-1725

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2023; Vol 18, No 2

DOI: 10.22100/jkh.v18i2.3048

Original Article

Development of a Diagnostic Panel to Measure the Viral Load and the Physical Status of the Human Papilloma Virus16 genome using Multiplex Real-Time PCR Method

Shadi Setayeshi (M.Sc.)[1], Yousef Yahyapour (Ph.D.)[2], Hossein Ghorbani (M.D.)[3], Fahimeh Nokhostin (M.D.)[4], Meghdad Bagheri (M.Sc.)[1], Farzin Sadeghi (Ph.D.)[5*]

1- Dept. of Microbiology and Biotechnology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.
2- Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Iran.
3- Dept. of Pathology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.
4- Dept. of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences Yazd, Iran.
5- Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

Received: 21 July 2022**, Accepted:** 5 March 2023

Abstract:

Introduction: *Higher viral load in women with chronic Human Papillomavirus type 16 (HPV 16) infection and integration of the viral genome into the cell's chromosomes associates with an increased prevalence of premalignant/malignant lesions in the cervix. The present study describes the development of simultaneous measurement of viral load and physical status for the HPV16 genome by the Multiplex Real-Time PCR method.*

Methods: *In this study, conserved genes (E^6 and E^2) of HPV16 were extracted from the CaSki cell line and, after PCR amplification, cloned in bacterial plasmid pJET1.2/blunt cloning vector. In addition, recombinant cellular RnaseP gene plasmid was used as an internal amplification control gene.*

Results: *Based on our findings, the E^2 and E^6 genes of the HPV16 virus and the cellular RnaseP gene are identified with high efficiency. Besides, the results of the Real-time PCR showed a high R^2 coefficient that reflects the linearity of the standard curve. The results of the E^2/E^6 ratio of CaSki cells (E^2/E^6 ratio=0.15) indicated the presence of both integrated and episomal forms in this cell line.*

Conclusion: *According to the pre-determined acceptance criteria, the diagnostic panel designed to measure the viral load and the physical status of the HPV16 genome using the Multiplex Real-Time PCR method has appropriate sensitivity and specificity.*

Keywords: Human papillomavirus 16; Viral load; Real-Time PCR; Molecular cloning.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** F. Sadeghi, **Email**: sadeghifarzin6@gmail.com*

Citation: Setayeshi Sh, Yahyapour Y, Ghorbani H, Nokhostin F, Bagheri M, Sadeghi F. Development of a diagnostic panel to measure the viral load and the physical status of the human papilloma virus16 genome using multiplex real-time PCR method. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(2):9-19.