



راه اندازی روش Real-time PCR برای تشخیص و تعیین کمی ویروس سرخک با استفاده از ژن F

طاهره زارعی^{۱*}، دکتر خسرو آقایی پور^۲، دکتر فرشید کفیل زاده^۳، دکتر عبدالحمید شوشتری^۴

^۱ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش بیوتکنولوژی
^۲ دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش تحقیق و تشخیص بیماری های طیور

چکیده

سابقه و هدف: با وجود کنترل بیماری سرخک در جهان، اما گزارش هایی از ابتلا به این ویروس در جمعیت های واکسینه شده وجود دارد. بنابراین تشخیص دقیق و به موقع این ویروس ضروری است. روش های جدید مولکولی در تشخیص ویروس ارائه شده است که توان تعیین مقدار این ویروس را ندارند. هدف از این پژوهش، راه اندازی روش Real-time PCR با استفاده از ژن F ویروس سرخک بود. مواد و روش ها: این مطالعه با طراحی دو پرایمر و یک پروب راه اندازی و از ژن F کلون شده در داخل پلاسمید pET-22b(+) استفاده گردید. رقت های متوالی در مبنای ۱۰ از پلاسمید استاندارد حاوی ژن آماده شد و منحنی استاندارد رسم گردید. جهت انجام پروژه از کیت Taq Man ساخت شرکت ABI استفاده گردید.

یافته ها: حداقل ۳۰ ذره ویروسی در هر واکنش مشخص گردید و در محدوده رقت های 10^{-4} تا 10^{-9} معادل $(3 \times 10^6 - 3 \times 10^1)$ نسخه بهترین حالت خطی برای منحنی استاندارد دیده شد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که تکنیک Real-time PCR می تواند به عنوان روشی بسیار اختصاصی و سریع برای تشخیص و تعیین تعداد ویروس سرخک از نمونه های حاوی این ویروس به کار رود.

واژگان کلیدی: ویروس سرخک، ژن F، Real-time PCR

دریافت مقاله: مهر ۱۳۸۸ پذیرش برای چاپ: آذر ۱۳۸۸

مقدمه

نمونه های بالینی و یا تعیین مقدار کمی در طی فرایند تولید واکسن برای بهینه کردن استانداردهای بهداشتی یک جامعه ضروری می باشد (۲). سازمان بهداشت جهانی از همه کشورها و مراکز بهداشتی جهان خواسته است تا توجه به این بیماری عفونی و پایش سطح ایمنی جامعه را در الویت های موسسات بهداشتی قرار دهند و در مطالعات بیولوژیکی خود علاوه بر تست های سرولوژیکی از روش های مولکولی نیز استفاده کنند (۳). از آن جایی که روش های موجود مولکولی توان تعیین مقدار ویروس را ندارند لذا به تازگی

ویروس سرخک از خانواده پارامیکسوویریده و جنس موربیلی ویروس ها است. این ویروس عامل بیماری مسری و حاد سرخک در انسان می باشد (۱). این بیماری عفونی محدود به دوران کودکی نیست و در بسیاری از افراد سالخورده نیز باعث بروز بیماری می گردد، از این رو تشخیص دقیق و به هنگام این ویروس خواه در

* آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۳۸۹۹۰۹۷۰۰

پست الکترونیک: tahereh.zarei71@yahoo.com

جدول ۱: پرایمرها و پروب استفاده شده در این مطالعه.

OligonucleotideName	Sequence(5'to3')
F463_485F	GCGAGCCTGGAAACTAATCA
F539_517R	CCCTGAACAGCCAATATCATCTC
F490_515P	ATTGAGGCAATGAGACAAGCAGGGCA

امکان پذیر است که در مقایسه با روش های سرولوژیکی رایج بسیار سریع، دقیق تر و حساس تر می باشد.

مواد و روش ها

ویروس سرخک سویه واکسینال AIK-C از بخش سرخک موسسه رازی تهیه شد. برای طراحی یک جفت پرایمر یک قطعه از ژن F به اندازه ۷۶bp استفاده شد که مناسب Real-time PCR می باشد. این پرایمرها و یک پروب به شرکت BIONEER سفارش داده شد.

پرایمرهای فرادست و فرودست (شماره ۱ و ۲) و پروب (شماره ۳) توسط برنامه Oligo و از توالی موجود در بانک ژن طراحی و استفاده شد. پروب به کار رفته شامل یک الیگونوکلئوتید است که انتهای ۵ آن به وسیله رنگ فلورسنت گزارشگر 6-FAM و انتهای ۳ آن به وسیله رنگ مهاگر BHQ1 (از انواع رنگ های سیاه) نشانه گذاری شده است.

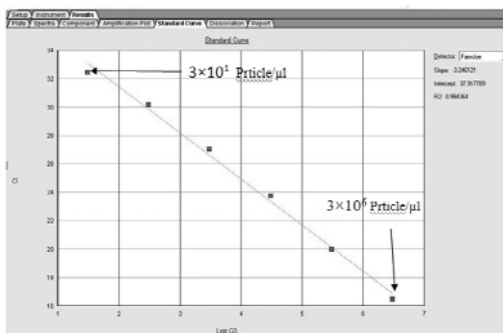
در ابتدا پلاسمید نوترکیب حاوی ژن F یعنی pET-22b(+)-F (ژن F که قبلا درون پلاسمید pET_22b(+), Novagen، آلمان) کلون شده بود) با استفاده از روش شوک حرارتی ترانسفورم گردید تا تعداد پلاسمید به حد مورد نیاز برسد، سپس استخراج پلاسمید انجام پذیرفت. برای تخلیص پلاسمید از کیت ساخت شرکت Roche (آلمان) به نام High Pure Plasmid Isolation Kit استفاده شد. پس از استخراج پلاسمید، به منظور بررسی صحت پلاسمیدهای استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و هضم آنزیمی پلاسمید استفاده شد. پس از تخلیص پلاسمید غلظت پلاسمید با استفاده از نانودرآپ به دست آمد (۲۳۷/۸ng/μl) و براساس فرمول شمارش نسخه، تعداد نسخه ژن هدف دقیقا محاسبه شد. سپس از پلاسمید حاوی ژن رقت های متوالی ده تایی (۱۰^{-۴} تا ۱۰^{-۹}) تهیه و با پرایمرهای اختصاصی منحنی

روش جدیدی به نام Real-time PCR معرفی شده است که امکان کمی کردن PCR مرسوم را به صورت بسیار اختصاصی، حساس و با قابلیت تکرار بالا فراهم نموده است و مزایایی چون نشان دادن وضعیت واقعی حین آزمایش، امکان تعیین مقدار ویروس را نیز دارد. این روش جایگزین مناسبی برای سایر شکل های RT-PCR کمی مرسوم است که در آن ها تولید محصول را فقط در پایان کار می توان تشخیص داد (۴). در اکثر مطالعات گذشته در تشخیص سرخک از ژن های همگلوپتینین (H)، نوکلئوکپسید (N) و فیوژن (F) برای ردیابی اسید نوکلئیک ویروس سرخک به روش Real-time PCR استفاده شده است (۲ و ۵-۷). در مطالعه کیمبرلی و همکاران در سال ۲۰۰۶ از ژن های H، N و F در ردیابی ویروس سرخک با تکنیک Real-time PCR استفاده شد (۶). Thomas و همکارانش در سال ۲۰۰۷ از Real-time PCR برای ارزیابی مقداری ژن همگلوپتینین (H) ویروس سرخک استفاده کردند (۸). از آن جایی که تعیین تعداد ذرات ویروس سرخک به وسیله شمارش یا تیتراژ کردن در کشت سلولی صورت می گیرد، روشی وقت گیر و پرزحمت می باشد. هدف از این پژوهش راه اندازی روش Real-time PCR با استفاده از ژن F ویروس سرخک می باشد. پروتئین F در خانواده پارامیکسوویروس بسیار محافظت شده است، زیرا ژن F از پایدارترین ژن های ویروس سرخک محسوب می شود و لذا در این تحقیق مورد هدف قرار گرفته است. با راه اندازی این روش می توان میزان ویروس سرخک را در فرآورده های بیولوژیکی در حداقل زمان ممکن، با حساسیت بسیار بالا بررسی نمود. از این روش هم چنین می توان در کنار روش های متداول به منظور تخمین سریع مقدار ویروس در محیط کشت سلولی برای کنترل کیفی واکسن سرخک به طور گسترده ای استفاده نمود. با این روش مولکولی تشخیص سریع بیماران مشکوک به ابتلا به بیماری سرخک

صورت زیر تهیه شد: مخلوطی از ۶ ml از PCR Master Mix (2x) TaqMan universal (شامل: Passive reference (ROX)، AmpliTaq، Optimized buffer components، dNTPs و Gold®DNA Polymerase) و ۰/۵ ml از مخلوط پرایمرهای رو به جلو (F) و برگردان (R) و ۰/۵ ml از پروب TaqMan و ۵ ml از رقت های ده مرتبه ای پلاسمید حاوی ژن F به عنوان الگو آماده شد. واکنش توسط دستگاه Real-time PCR شرکت ABI مدل ۷۵۰۰ (آمریکا) و تحت شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه به منظور فعال سازی آنزیم AmpliTaq Gold®DNA Polymerase و در ادامه ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه (denaturation) و ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه (annealing and extension) انجام گردید. تکرارپذیری آزمایش در سطح Intra assay (در چاهک های مختلف و هم زمان) و نیز در سطح Inter assay (در روزهای مختلف) بررسی گردید و نتایج مقدار Inter and Intra assay variability بر حسب value بیان شد. ضریب تغییرات CV یک واکنش از تقسیم انحراف استاندارد بر میانگین ارزش C_T برای نمونه در هر تست جداگانه محاسبه و برای ثبت این اطلاعات از نرم افزار Matlab استفاده شد.

یافته ها

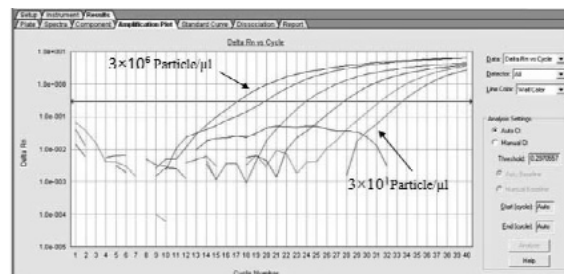
برای ارزیابی خطی بودن روش Real-time PCR رقت های ده مرتبه ای از پلاسمید حاوی ژن یعنی رقت های 10^{-9} تا 10^{-1} معادل $(3 \times 10^1 - 3 \times 10^6)$ ذره در یک میکرولیتر برای تکنیک TaqMan Probe



شکل ۲: نمودار منحنی استاندارد رقت های متوالی از 10^{-9} تا 10^{-4} معادل $(3 \times 10^6 - 3 \times 10^1)$ ذره در یک میکرولیتر از استاندارد با استفاده از پرایمرهای F463_485F و F539_517R

استاندارد رسم شد. به این ترتیب که پس از اتمام واکنش با استفاده از رقت های مختلف از استانداردهای تهیه شده تعداد نسخه های رقت های استفاده شده به دستگاه داده شد و منحنی استاندارد رسم گردید. با در نظر گرفتن تمام معیارهای کیفی لازم (ضریب رگرسیون یا R^2 ، y -intercept و شیب خط یا Slope) برای رسم یک منحنی استاندارد دقیق، کیفیت منحنی استاندارد تهیه شده به عنوان مرجع مقدار سنجی برای تکنیک TaqMan Probe به کار گرفته شد. این معیارها براساس مقالات بهینه شده است (۹). منحنی استاندارد از دو عامل Cycle threshold (C_T) نمونه در هر دور در مقابل لگاریتم رقت های متوالی از اسید نوکلئیک هدف (پلاسمید + ژن هدف) به دست می آید. اتصال نقطه تقاطع این دو معیار به هم شیب خط یا Slope است که نشان دهنده کارایی واکنش PCR انجام شده می باشد. محدوده معمولی برای این شیب ($10\% \pm 3/3$) است. شاخص مهم دیگر یعنی ضریب رگرسیون (R^2) یا ضریب ارتباط در یک منحنی استاندارد ایده آل باید $1 \pm 0/98$ باشد، ضریب ارتباط R^2 نشان دهنده چگونگی انجام واکنش PCR در یک چاهک و گویای میزان دقت لازم برای تهیه رقت های متوالی ده تایی و تزریق مواد درون چاهک ها می باشد. شاخص مهم دیگر که نشان دهنده حساسیت روش و دقت مقدارسنجی می باشد y -intercept است که در یک منحنی استاندارد ایده آل ما بین سیکل های ۳۷-۳۳ می باشد (۹).

واکنش Real-time PCR با استفاده از کیت TaqMan Probe شرکت ABI Applied Biosystems انجام پذیرفت. ترکیبات مورد نیاز برای انجام واکنش Real-time PCR در حجم ۱۲ ml به



شکل ۱: نمودار منحنی تکثیر با رقت های متوالی 10^{-4} تا 10^{-9} معادل $(3 \times 10^6 - 3 \times 10^1)$ ذره در یک میکرولیتر از استاندارد با استفاده از پرایمرهای F463_485F و F539_517R

آزمایش شد و تنها در شش رقت متوالی 10^{-4} تا 10^{-9} معادل $(3 \times 10^6 - 3 \times 10^1)$ ذره در یک میکرولیتر بهترین حالت خطی برای منحنی استاندارد مشاهده شد. در این محدوده کلیه معیارهای Slope، Intercept و R2 در دامنه تایید شده Real-time PCR قرار گرفتند (شکل ۱ و ۲). برای پارامتر y-intercept که نشان دهنده حساسیت روش و دقت مقدار سنجی می باشد، مقدار $35/07$ بدست آمد، ضریب R2، $0/99$ و Slope با مقدار $3/24$ به دست آمد که نشان دهنده کارایی بالایی واکنش انجام شده می باشد. میزان Intra assay $0/3$ ٪ و Inter assay $1/1$ ٪ محاسبه گردید. بنابراین در محدوده رقت های 10^{-4} تا 10^{-9} دامنه تغییرات در یک واکنش و در بین چندین واکنش بسیار پایین می باشد.

بحث

بیماری سرخک یکی از مسری ترین بیماری های عفونی دوران کودکی است. امروزه واکسیناسیون نوزادان و کودکان تا حد زیادی از موارد ابتلا به نوع وحشی این بیماری کاسته است اما هم چنان در کودکانی که از ضعف سیستم ایمنی رنج می برند ممکن است واکسیناسیون با شکست مواجه شود و هم چنین مواردی از ابتلا به بیماری سرخک در کودکان واکسینه شده نیز مشاهده شده است. بنابراین تشخیص کیفی سریع این ویروس در نمونه های بالینی یا تعیین مقدار آن در طی فرایند تولید واکسن می تواند در بهینه کردن استانداردهای بهداشتی یک جامعه مفید باشد (۱۱-۱۳). به طور متداول تست استاندارد برای تشخیص بیماری سرخک تست های سرولوژیکی می باشند (۲). اگر چه روش آنزیم ایمنواسی آنتی بادی IgM در فاز حاد سرمی به عنوان شایع ترین روش آزمایشگاهی برای تایید عفونت ویروس سرخک از حساسیت بالایی حدود $89-83$ ٪ و اختصاصیت حدود $100-95$ ٪ برخوردار است اما به دلیل نتایج منفی کاذب در نمونه های سرمی جمع آوری شده زودتر از شروع راش پوستی و نتایج مثبت کاذب ناشی از حضور آنتی بادی IgM دیگر عوامل بیماری زا مانند روبلا و پاروویروس B19 و فاکتور روماتوئید (RF)، راه اندازی روشی حساس مانند Real-time PCR برای شناسایی سریع و اختصاصی RNA ویروس ضروری به نظر می رسد (۶). به تازگی در بسیاری از مراکز تحقیقاتی روش Nested PCR

استفاده می شود که به خوبی ویروس سرخک را در نمونه های مختلف کلینیکی در کمتر از هفت روز بعد از شروع علائم راش پوستی تشخیص می دهد، اما انجام این آزمایش ۲ روز کاری زمان نیاز دارد این در حالی است که Real-time PCR در یک روز کاری ویروس سرخک را تشخیص دهد و قادر است از نمونه هایی که در ۷ روز اول بیماری جمع آوری شده نیز ویروس را شناسایی کند (۸). Morita و همکارانش در سال ۲۰۰۷ روش ژنتیکی Nested RT-PCR را برای تشخیص ویروس سرخک به کار بردند و اظهار کردند که در حالی که این روش ممکن است خیلی حساس باشد ولی بیشتر از ۸ ساعت زمان نیاز دارد (۱۶-۱۴). Ozoemena و همکارانش روش Nested RT-PCR را نسبت به روش RT-PCR مرسوم در تشخیص ویروس سرخک ۱۰ تا ۱۰۰ برابر حساس تر معرفی نمودند. ولی اظهار کردند که تکنیک Nested PCR به دلیل مشکل آلودگی متقاطع نمونه ها با الگوهای DNA که از قبل در آزمایشگاه وجود داشته اند و یا با دیگر نمونه های کنترل مثبت مورد انتقاد قرار گرفته است (۵). بنابراین به منظور بهبود این مشکلات، روش Real-time PCR به منظور ردیابی ژنوم ویروس های مختلف به کار گرفته شده است. از مزیت های مهم این روش قابلیت مقدار سنجی اسیدنوکلئیک ویروس در غلظت های پائین و هم چنین کاهش نتایج مثبت کاذب به دلیل عدم نیاز به فرایندهای بررسی بعد از PCR می باشد (۸). به کمک روش Real-time PCR و تعیین مقدار ویروس واکسن می توان مرحله دقیق عفونت زایی و بیماری زایی ویروس سرخک را مشخص نمود و بنابراین به کمک این روش از ایجاد بیماری سرخک و علائم مرتبط به آن جلوگیری کرد (۶-۸، ۱۷ و ۱۸). طی مطالعاتی که توسط Brenda و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Akiyama و همکاران در سال ۲۰۰۹ برای آشکار سازی RNA ویروس سرخک در دامنه وسیعی از نمونه های کلینیکی توسط روش حساس Real-time PCR صورت گرفت، به اختصاصیت بالایی این روش اشاره شده است. به طوری که هیچ نوع از ویروس های تنفسی، انتروویروس، ویروس های سین سی شیال تنفسی و ویروس های آنفلونزا (ساب تایپ A و B) در ارزیابی با تکنیک Real-time PCR آشکار نشدند (۸ و ۱۰). Sebastein و همکاران در تحقیقی بیان کردند Real-time PCR برای پی گیری

واکسینال AIK-C برای تشخیص و تعیین مقدار ویروس با روش TaqMan probe استفاده شد. سویه AIK-C واکسن تخفیف حدت یافته ای از ژنوتیپ A ویروس است که از سویه ویرولان ادمنستون آمریکا با همکاری موسسه رازی ایران و کیتازاتو ژاپن تهیه شده است. کیمبرلی و همکاران، پرایمرها و پروب ژن F براساس سویه واکسن (ژنوتیپ A) طراحی شده و قابلیت تشخیص RNA ویروس و شناسایی ژنوتیپ فعال در نمونه را دارد (۶). بر همین اساس در این مطالعه نیز با طراحی یک جفت پرایمر براساس سویه AIK-C و استفاده از پروب طراحی شده در مقاله Kimberly، Real-time PCR، راه اندازی گردید که با استفاده از ژن F ویروس سرخک بوده است، برای رسم منحنی استاندارد از ژن F کلون شده داخل پلاسمید (+) pET-22b استفاده گردید، پس از انجام مراحل متعدد، این روش قابلیت تعیین $10^1 \times 3 - 10^6 \times 3$ ذره در یک میکرولیتر از استاندارد را نشان داد، همچنین در مطالعه کیمبرلی در سال ۲۰۰۶ میزان Intra assay مربوط به ژن F حدود ۲/۳٪ و میزان Inter assay برای همه رقت ها حدود ۵ درصد برای ژن F بوده است (۶). بنابراین در این مطالعه روش TaqMan probe که با استفاده از DNA plasmid Standard Curve راه اندازی شده، با توان تشخیص حداقل ۳۰ نسخه ژن در هر میکرولیتر با توجه به مقالات گزارش شده معتبر می باشد (۲ و ۶).

نتیجه گیری

ما در این پژوهش موفق به راه اندازی روش Real-time PCR و قابلیت مقدار سنجی دقیق آن تا حدود ۳۰ ذره در هر واکنش شدیم. این روش می تواند در کنار روش های متداول امروزی مانند CCID50 و Plaque assay که روش های به نسبت وقت گیری هستند برای تشخیص بیماری سرخک و آسان تر نمودن روند تحقیقات در تعیین ویروس به کار گرفته شود. با راه اندازی روش سریع و آسان Real-time PCR می توان عیار ویروس را تعیین نمود. این روش به ویژه در شیوع ها و اپیدمی ها که نیاز به تشخیص سریع می باشد بسیار موثر بوده و کارایی زیادی دارد.

جمعیت های آلوده با بیماری های ویروسی سرخک و بررسی جداسازی ویروس سرخک از نمونه های کلینیکی بسیار حساس و مفید می باشد (۱۷). در ایران نیز Real-time PCR در سال های گذشته در موسسه سرم سازی رازی کرج برای ژن N و H راه اندازی شده است. این تحقیق با استفاده از تکنیک TaqMan و براساس ژن فیوژن F با امکان تشخیص و تعیین مقدار ویروس سرخک سویه AIK-C راه اندازی شده است. دلیل انتخاب ژن F به عنوان ژن هدف، بازنگری مقالات و بررسی هایی بود که بیان می کند که پروتئین F در خانواده پارامیکسوویروس بسیار محافظت شده است. ژن F از پایدارترین ژن های ویروس سرخک محسوب می شود. گلیکوپروتئین F دارای تعدادی توالی های ایمونوژن است و بنابراین می توان گفت که این پروتئین نقش مهمی را در ایمن سازی دارد (۱۶). در مطالعه کیمبرلی از ژن F در دیابلی ویروس سرخک با Real-time PCR، امکان جداسازی و تعیین تعداد ژنوم ویروس سرخک با استفاده از روش مذکور در حدود ۸۲٪ موارد مثبت تایید شده در مورد ژن F می باشد. در حالی که در روش RT-PCR تنها ۴۱٪ از این موارد تایید شده مثبت گزارش شده است (۶). در مطالعه دیگری که Bradstreet و Uhlmann با استفاده از تکنیک Real-time PCR اختصاصی برای ژن های F و H انجام دادند توانستند کمتر یا برابر با یک نسخه از RNA ویروس سرخک را آشکار کنند (۲۰ و ۲۱). به تازگی چندین آزمایشگاه از تکنولوژی TaqMan به منظور آشکار سازی توالی های ژن های F، N و H ویروس سرخک استفاده شده است. این روش نسبت به PCR معمولی و سایر گرین حساس تر بوده و برای تشخیص و تعیین مقدار ویروس روشی آسان، سریع، حساس و اختصاصی می باشد (۲، ۱۷ و ۲۰). Uhlmann و همکارانش روش TaqMan RT-PCR را برای آشکار ساختن توالی های ژنوم ویروس سرخک در روده بیماران با انتروکولیت کاذب به کار بردند (۲۱). Hernandez و همکارانش در مطالعات خود عنوان کردند که روش TaqMan RT-PCR ده برابر حساس تر از روش PCR مرسوم و هم چنین اختصاصیت این روش نسبت به SYBR Green و PCR مرسوم باز هم بیشتر می باشد (۲۴-۲۲).

در این مطالعه قطعه ۷۶bp از ژن F ویروس سرخک سویه

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از بخش بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج و دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم اعلام می دارند.

References

1. Knipe D, Howley P. *Filds Virology* (fifth edition). Lippincott Williams and Wilkins, 2006, ISBN 0-7817-1832-5.
2. El Mubarakab HS, De Swarta RL, Osterhaus ADME, Schuttena M. Development of a semi-quantitative Real-Time RT PCR for the detection of measles virus. *J Clin virol*. 2005; 32:313-317.
3. Wakefield AH. Detection of measles virus genomic RNA in cerebrospinal fluid of children with regressive autism: a report of three cases. *J Am Phys Surg*. 2004; 9(2):38-45.
4. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*. 2005; 39:75-85.
5. Ozoemena LC, Minor PD, Afzal MA. Comparative evaluation of measles virus specific TaqMan PCR and conventional PCR using synthetic and natural RNA templates. *J Med virol*. 2004; 73:79-84.
6. Kimberly B, Hummel, Lowe L, Bellini WJ, Rota PA. Development of quantitative gene-specific Real-Time RT PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens. *J Virol Meth*. 2006; 132: 166-173.
7. Schalk JAC, van den Elzen C, Ovelgonne H, Baas C, Peter MJ, Jongen M. Estimation of the number of infectious measles viruses in live virus vaccines using quantitative Real-Time PCR. *J virol meth*. 2004; 117:179-187.
8. Thomas B, Beard S, Jin L, Brown KE, Brown DWG. Development and evaluation of a Real-Time PCR assay for rapid identification and semi-quantitation of measles virus. *J Med virol*. 2007; 79:1587-1592.
9. Tefvik Dorak M. Real-Time PCR (Advanced methods). 2007; ISBN-13: 978-0-4153-77348.
10. Akiyama M, Kimura H, Tsukagoshi H, Taira K, Mizuta K, Saitoh M, Nagano M, Sutoh A, Noda M, Morita Y, Sakatsume O, Okabe N, Tashiro M. Development of an assay for the detection and quantification of the measles virus nucleoprotein (N) gene using Real-Time reverse transcriptase PCR. *J Med Microbiol*. 2009; 58:683-643.
11. Thompson RCA. *Molecular Epidemiology of Infectious Disease*. 2006; ISBN 0 340 759097.
12. Schneider-Schaulies J, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Measles virus interaction with cellular receptor: consequences for viral pathogenesis. *J Neurovirol*. 2001; 7: 391-399.
13. Schneider H, Kaelin K, Billeter MA. Recombinant measles virus defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology*. 1997; 227:314-322.
14. Drago L, Lombardi A, De Vecchi E, Giuliani G, Bartolone R, Gismondo MR. Comparison of nested PCR real time PCR of Herpesvirus infections of central nervous system in HIV patients. *BMC Infect Dis*. 2004; 4-55.
15. Llop P, Bonaterra A, Penalver J, Lopez MM. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Appl Environ Microbol*. 2000; 66:2071-2078.
16. Morita Y, Suzuki T, Shiono M, Shiobara M, Saitoh M, Tsukagoshi H, Yoshizumi M, Ishioka T, Kato M, Kozawa K, Ttanaka-Taya K, Yasui Y, Noda M, Okabe N, Kimura H. Sequence and phylogenetic analysis of the nucleoprotein (N) gene in measles viruses prevalent in Gunma Japan. *Jpn Infect Dis*. 2007; 60:402-404.
17. Plummet S, Gerlier D. Optimized Sybr Green Real-Time PCR assay to quantify the absolute copy number of measles virus RNAs using gene specific primers. *J virol methods*. 2005; 128:79-87.
18. Min BS, Noh YJ, Shin JH, Baek SY, Min KI, Ryu SR, Kim BG, Park MK, Choi SE, Yang EH, Park SN, Hur SJ, Ahn BY. Assessment of the quantitative Real-Time polymerase chain reaction using a cDNA standard for human group A rotavirus. *J virol methods*. 2006; 137: 280-286.
19. Bukland R, Gerald C. Fusion glycoprotein of measles virus: Nucleotide sequence of the gene and comparison with other Paramyxoviruses. *J gen Virol*. 1987; 68:1695-1703.
20. Bradstreet JJ, El Dahr J, Anthony A, Kartzinell JJ, Wakefield AH. Detection of measles virus genomic RNA in cerebrospinal fluid of children with regressive autism: a report of three cases. *J Am Phys Surg*. 2004; 9(2):38-45.
21. Uhlman V, Martin CM, Sheils O, Pilkington L, Silva I, Killalea A, Murch SB, Walker-Smith J, Thomson M,

- Wakefield AJ, O'Leary JJ. Potential viral pathogenic mechanism for new variant inflammatory bowel disease. *Mol Pathol*. 2002; 55:84-90.
22. Stamley FR, Patel MM, Holloway BP, Pellet PE. Quantitative fluorogenic probe PCR assay for detection of human Herpesvirus 8 DNA in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2006; 39:3537-3540.
23. Kreuzer KA, Lass U, Nagel S, Ellerbrok H, Pauli G, Pawlaczyk-Peter B, Siegert W, Huhn D, Schmidt CA. Applicability of an absolute quantitative procedure to monitor intra-individual bcr/abl transcript kinetics in clinical samples from chronic myelogenous leukemia patients. *Int J Cancer*. 2000; 86:741-746.
24. King DP, Reid SM, Hutchings GH, Grierson SS, Wilkinson PJ, Dixon LK, Bastos AD, Drew TW. Development of a Taq Man PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *J Virol Methods*. 2003; 107:53-61.



Optimization of Real-time PCR method to quantify the measles viral particles by using F gene

Tahereh Zarei¹, Khosrow Aghaiypour¹, Farshid Kafilzadeh²,
Abdolhamid Shoshtari²

¹M.Sc. Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

¹Assistant Professor, Department of Biotechnology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran.

²Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

² Assistant Professor, Department of Research and Detection of Pultri Diseases, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Abstract

Background and objective: Although measles disease has controlled measles disease worldwide, there are some reports of the viral infection in vaccinated populations. Therefore, accurate and timely diagnosis is essential for the virus. Most of new molecular methods for virus detection cannot quantify the virus load. The purpose of this study was to set up Real-time PCR method using measles virus F gene.

Materials and methods: Firstly, two primers and a probe from the F gene cloned into plasmid pET-22b (+)(Novagen) were designed. A ten fold serial dilution of standard plasmid containing the gene was prepared and a standard curve was plotted. The project was carried out on the 7500 Real-Time PCR detection System (Applied Biosystems) with Taq man kit (Applied Biosystems).

Result: At least 30 viral particles per reaction could be determined and the dilutions between 10⁻⁴ to 10⁻⁹ equivalent (3×10¹ to 3×10⁶ copies of the standard curve) were linear at best.

Conclusion: Real-time PCR results showed that the technique can be used as highly specific and rapid method to detect and to determine the number of measles viral particles from the samples containing the virus.

Keywords: Measles virus, F gene, Real-time PCR.

Correspondence to: Tahereh Zarei

Tel: +989389909700

E-mail: tahereh_zarei71@yahoo.com

Journal of Microbial World 2010, 2(4) - 227-234