A Review of Optimization Strategies and the Advantages and Disadvantages of using Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-Pair primers (PCR-CTPP) in Genomics Studies

Zeinab Jamshidi[1], Kheirollah Yari[2]

1.BSc Student, Biotechnology Department, Faculty of Sciences, Malayer University, Malayer, Iran, ORCID ID: 0000-0002-6573-326x

2. Assistant Professor, Medical Biology Research Center, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran, (Corresponding Author), Tel:083-34276473, Email:kyari@kums.ac.ir. ORCID ID: 0000-0002-8592-7651

ABSTRACT

Background and Aim: There are several methods for genotyping single nucleotide polymorphisms (SNPs). Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) is an inexpensive, quick, reliable, time saving and cost effective method that is applicable for SNPs genotyping compared to other related methods. In the PCR-CTPP technique, allele-specific products of the genes are selectively amplified by adding two pairs of four primers and ordinarily prepared PCR mixture in a single PCR tube. Four allele-specific primers are F1 (sense) and R1 (antisense) primers for one allele that R1 has an anti-sense nucleotide at the 3′ end and F2 (sense) and R2 (antisense) for the other allele that F2 has a sense nucleotide at the 3′ end. PCR-CTPP produces three products with different sizes which can make possible genotyping of SNP by gel electrophoresis. To increase the reproducibility and accuracy of the PCR-CTPP results, it is better to optimize protocol before sample genotyping. The aim of this study was to review the currently used strategies for optimum application and determination of advantages and disadvantages of the PCR-CTPP method in SNPs genotyping.

Materials and Methods: The articles related to the PCR-CTPP method were searched from databases such as ISI Web of science, Science direct, Pubmed, Google Scholar, SID, and Scopus.

Results: For more efficiency and reproducibility of the PCR-CTPP method, we should consider the specificity and similarity of melting temperatures of the designed primers by using algorithms and specific primer design softwares.

Conclusion: Strategies for optimizing the concentration ratio of internal and external primers, adding amplification additives to the PCR reaction mix, and use of the touchdown program are also recommended.

Keywords: PCR, PCR with confronting two-pair primers, Genomics, Single nucleotide polymorphism, Genotyping

Received: Aug 24, 2021 **Accepted:** Sep 4, 2022

How to cite the article: Zeinab Jamshidi, Kheirollah Yari. A Review of Optimization Strategies and the Advantages and Disadvantages of using Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-Pair primers (PCR-CTPP) in Genomics Studies.SJKU 2022:27(4):121-132.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-05]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.121]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و هفت / مهر و آبان ۱۴۰۱/۱۳۲-۱۲۱

مروری بر استراتژی‌های بهینه‌سازی و معایب و مزایای روشPCR با استفاده از پرایمر های دو جفتی(PCR-CTPP) در مطالعات ژنومیکس

زینب جمشیدی[1]، خیراله یاری[2]

۱. دانشجوی کارشناسی بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر، همدان، ایران، کد ارکید: ۳۲۶x-۶۵۷۳-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، پژوهشکده فناوری‌های سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران، (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: kyari@kums.ac.ir، تلفن: ۳۴۲۷۶۴۷۳-۰۸۷، کد ارکید:۷۶۵۱-۸۵۹۲-۰۰۰۲-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: روش های مختلفی برای تعیین ژنوتیپ در پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی وجود دارد. روش PCR با استفاده از پرایمر های دو جفتی (PCR-CTPP) روشی مناسب، کم هزینه، سریع برای تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs) است که نسبت به سایر روش‌ها در زمان و هزینه صرفه‌جویی می‌کند. در روشPCR-CTPP، محصولات اختصاصی آلل ژن مورد نظر به‌صورت انتخابی با اضافه کردن دو جفت پرایمر به همراه میکس معمول PCR در یک لوله تکثیر می‌شوند. چهار پرایمر وابسته به آلل شامل، پرایمر F1 (سنس) و R1 (آنتی سنس) برای یک آلل که پرایمر R1 نوکلئوتید آنتی سنس را در انتهای ′3 خود دارد و پرایمرهای F2 (سنس) و R2 (آنتی سنس) برای آلل دیگر که F2، نوکلئوتید سنس را در انتهای ′3 خود دارد. در PCR-CTPP سه محصول با سایزهای مختلف تکثیر می‌شوند که امکان تعیین ژنوتیپ SNP را در ژل الکتروفورز فراهم می‌کند. به منظور افزایش تکرارپذیری و دقت نتایج PCR-CTPP، بهتر است قبل از تعیین ژنوتیپ نمونه، پروتکل این روش بهینه گردد. هدف این مطالعه مروری بر استراتژی‌های استفاده شده برای کاربرد بهینه و ذکر معایب و مزایای روش PCR-CTPP در مطالعات تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی است.

مواد و روش‌ها: مقالات مرتبط با روش PCR-CTPP از پایگاه های داده‌ای مانند ISI web of Science، Science direct، Pubmed، Google scholar، SID و Scopus جستجو شد.

یافته‌ها: برای کارایی بیشتر و تکرارپذیری روش CTPP پیشنهاد می‌شود با الگوریتم و نرم افزارهای اختصاصی طراحی پرایمر، به اختصاصیت و یکسانی دماهای ذوب پرایمرهای طراحی شده توجه کرد.

نتیجه‌گیری: استراتژی های بهینه سازی نسبت غلظت پرایمرهای داخلی و خارجی، اضافه کردنی مواد افزودنی تقویت کننده تکثیر به میکس واکنش PCR و استفاده از برنامه touchdown نیز پیشنهاد می شود.

واژه های کلیدی: PCR، PCR با استفاده از پرایمر های دو جفتی ژنوم، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی تعیین ژنوتیپ

وصول مقاله:۱۴۰۰/۶/۲ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۱/۵/۱۸ پذیرش:۱۴۰۱/۶/۱۳

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-05]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.121]

مقدمه

اکثر بیماری های انسانی می توانند زمینه ژنتیکی داشته باشند؛ لذا پژوهشگران برای مطالعه ژنوم و درک بهتر تأثیر ژن‌ها بر بیماری‌ها و پیامدهای آن، روش‌هایی برای تعیین توالی یک ژن (ژن ها) و بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوم دنبال کرده اند(۱, ۲). به طور کلی تنوع ژنتیکی و واریانت های مختلف توالی های DNA می‌توانند در تنوع فنوتیپ ها، صفات، پاتوژنز بیماری های انسانی و متابولیسم و عملکرد داروها نقش داشته باشد(۳, ۴). هرگونه تغییر در ژنوم و یا کروموزوم که قابلیت توارث به نسل بعدی را داشته باشند جهش یا موتاسیون می‌نامند که می‌تواند وراثتی باشد و یا در اثر عوامل محیطی مانند اشعه و یا ویروس ها ایجاد شوند. اگر جهش فقط باعث تغییر یک نوکلئوتید شود و فراوانی آن در جامعه بیشتر از ۱٪ باشد به آن پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) می‌گویند(۵). SNP در حقیقت تغییر در توالی DNA است که در آن یک نوکلئوتید در ژنوم افراد یک گونه یا جمعیت و یا بین یک جفت کروموزوم در یک فرد متفاوت است(۶). به طور کلی SNPها از نظر موقعیت در ژنوم به دو دسته کلی طبقه بندی می شوند که شامل SNP های نواحی کد کننده که فراوانی کمی دارند و SNPهایی که در نواحی غیر کد کننده ژنوم هستند و معمولاً فراوانی بیشتری دارند می باشند.SNP ها می توانند کاربردهای زیادی در مطالعات ژنومیکس داشته باشند از جمله به عنوان نشانگرهای ملکولی در مطالعات ژنتیک بیماری‌ها، مهندسی و اصلاح ژنتیکی جمعیت، میانکنش دارو و DNA و نقشه یابی ژنتیکی استفاده می شوند(۷).

روش‌های مختلفی برای تعیین ژنوتیپ در پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی وجود دارد از جمله روش‌های مبتنی بر PCR که شامل روش‌های RFLP (Restriction fragment length polymorphism)(۸)، SSCP (Single-strand conformation polymorphism)، Real-time با استفاده از پروب Taq Man ، AS-PCR و تکنیک‌های SNP Array و Invader assay، پیروسکونسینگ و next-generation sequencing (NGS) است(۹). همچنین در سال‌های اخیر روش‌های جدیدی برای بررسی ژنوتیپSNPها معرفی‌شده‌اند که ترکیبی از Multiplex PCR و فناوریNGS مانند پلتفرم Ion Torrent(۱۰, ۱۱)، AmpSeq.(12) ، GBTS(13) وSeq-SNP در LGC (گروهLGC،انگلستان) می باشندکه این روش‌ها می‌تواند هزاران SNP را هم‌زمان تعیین ژنوتیپ کنند. ولی در میان روش‌های نام برده روش‌های-PCR RFLP، Taq Man و Microarrays به طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرند هرچند هرکدام از این روش‌ها نیز مزایا و معایبی دارند. به‌طور مثال محققین در بسیاری از آزمایشگاه‌ها تمایل دارند از روش -PCR RFLP برای تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم ها در جمعیت های نسبتاً کوچک استفاده کنند(۱۴). اگرچه روش PCR- RFLP به آنزیم محدودالاثر و البته صرف زمان زیاد برای عملکرد آنزیم برشی نیاز دارد و یا تکنیک Taq Man که روشی سریع است؛ اما پرهزینه می باشد(۱۵)، روش ریزآرایه(Microarray)یک فناوری مولکولی قوی است که امکان مطالعه و تجزیه‌وتحلیل هم‌زمان صدها هزار SNP و ارزیابی تعداد واریانت های آن‌ها دریک آزمایش واحد را فراهم می‌کند. در سال‌های اخیر ریزآرایه‌های مقرون به صرفه‌ای طراحی‌شده‌اند که حاوی بیش از ۸۰۰ هزار واریانت هستند که امکان ارزیابی طیف وسیعی از گونه‌های ژنتیکی را فراهم می‌کنند(۱۶). همچنین استفاده از ریزآرایه‌ها می‌تواند تصویری دقیق از بیان ژن در سلول یا نمونه زیستی مورد مطالعه را نشان دهد(۱۷). استفاده از ریزآرایه‌ها برای تعیین ژنوتیپ SNPها در کشورهای درحال توسعه پرهزینه است و ساخت آن برای هر بار استفاده زمان بر و برای ساخت نیاز به تجهیزات پیشرفته

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-05]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.121]

دارد همچنین تجزیه و تحلیل داده‌های آن نیز مشکل است. علاوه بر این یک ایراد معمول در استفاده از ریزآرایه‌ها این احتمال است که برخی اطلاعات SNP ها مانند مکان کروموزومی که برای طراحی ریزآرایه استفاده می شود قدیمی باشد؛ لذا در استفاده از SNP ها برای فرمت‌های مختلف آرایه‌های تعیین ژنوتیپ سازگاری وجود نداشته باشد(۱۸).یکی از روش‌های بررسی SNP ها توالی یابی Sanger است که به دلیل قابلیت اطمینان و دقت بالای آن به عنوان«استاندارد طلایی» جهانی شناخته شده است؛ ولی این روش به کارکنان فنی مجرب و ماهر و البته تجهیزات خاص برای انجام آزمایش.نیاز دارد؛ بنابراین استفاده وسیع از آن‌ها برای تشخیص SNP ها در آزمایشگاه عمومی دشوار است(۱۹). روش پیروسکونسینگ (Pyrosequencing) هم برای تعیین ژنوتیپ SNP مناسب است؛ زیرا تعیین ژنوتیپ SNPهای شناسایی شده به تعیین توالی فقط چند نوکلئوتید (۱-۵ جفت باز) نیاز دارد(۲۰). مزیت روش این است که هر پلی مورفیسم جدید قابل تشخیص است؛ ولی روش پیروسکونسینگ هم به تجهیزات ویژه‌ای برای توالی یابی و همچنین تزریق نوکلئوتیدها نیاز دارد(۵).هرچند پیشرفت‌های دهه‌های اخیر در فناوری‌های نسل جدید توالی‌یابی (NGS)، امکان بررسی SNPهای بیشتر را فراهم می کند. استفاده از پلتفرم‌های NGS، مانند Roche/454 FLX، Illumina Genome Analyzer و ABI SOLID، نه تنها باعث افزایش توان عملیاتی داده‌ها می‌شود، بلکه هزینه توالی‌یابی را نیز به‌طور چشمگیری کاهش می‌دهد(۲۱). همچنین از انواع تکنیک های برپایه PCR ازجمله ، Real Time PCR، Touchdown PCR، Allele-specific PCR، Nested-PCR، High Resolution Melt (HRM) و Multiplex PCR برای بررسی و تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی استفاده می‌شود(۲۲). تعیین ژنوتیپ با TaqMan (Real Time PCR) به دو پروب فلورسنت برای تشخیص محصولات PCR نیاز دارد، اگرچه تعیین ژنوتیپ با روش TaqMan دقیق و سریع است؛ اما هزینه‌های کار را افزایش می‌دهد(۱۹). یکی دیگر از روش‌های مطالعات پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی، روش Allele-specific PCR (AS-PCR)است که نمونه ها باید در چاهک‌های جداگانه در ژل آگارز الکتروفورز شوند؛ لذا برای هر سنجش نیاز به دو واکنش داشته باشد و هزینه آزمایش را دو برابر می‌کند(۱۹). Multiplex PCR یک نوع تغییر یافته از روش PCR است که در آن دو یا بیش از دو ناحیه از ژن به طور همزمان در یک واکنش تکثیر می‌شوند. در دو دهه اخیر از تکنیک PCR-CTPP(Confronting-two pair-polymerase chain reaction)که روشی مبتنی بر روش Multiplex PCR است برای بررسی ژنوتیپ انواع گسترده‌ای از پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی استفاده می‌شود(۲۳, ۲۴). تکنیک PCR-CTPP اولین بار توسط Nobuyuki Hamajima در سال ۲۰۰۰ معرفی شد. در جدول ۱ به مقایسه مزایا و معایب روش PCR-CTPP با روش‌های معمول برای بررسی پلی مورفیسم ها پرداخته شده است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-05]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.121]

جدول۱. مقایسه برخی تکنیک های معمول استفاده شده در تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم ها

تکنیک	معایب	مزایا	هزینه
Taq man	پرهزینه	سریع	زیاد
PCR-RFLP	زمان بر	کم هزینه	کم
PCR-CTPP	لزوم بهینه سازی دمای ذوب پرایمرهای مختلف	سریع و مقرون به‌صرفه	کم
Micro arrays	پرهزینه، دشوار بودن دسترسی به الگوهای بیان ژن و زمان بر بودن تحلیل نتایج	سرعت در انجام کار، امکان بررسی تعداد زیادی ژن به صورت هم‌زمان	زیاد

هدف این مطالعه، مروری بر استراتژی‌های بکار رفته برای کاربرد بهینه و ذکر معایب و مزایای روش PCR-CTPP در مطالعات تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی است.

مواد و روش ها

مقالات مرتبط با روش PCR-CTPP در پایگاه‌های داده‌ای مانند ISI web of Science، Science direct، Pubmed، Google scholar، SID و Scopus تا پایان ماه مارچ ۲۰۲۱ جستجو شد. از کلید واژه‌های "PCR-CTPP"، " PCR using two-pair primers,"، " Single Nucleotide Polymorphism "، "Genotyping "، " SNP " و معادل فارسی آن ها برای جستجو در منابع مدنظر استفاده گردید. در ابتدا خلاصه مقالات مورد بررسی گردید و مقالاتی که از روش PCR-CTPP برای تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی استفاده کرده بودند انتخاب گردیدند. بر اساس خلاصه مقالات، چنانچه موضوع مقاله با هدف تطابق نداشت از مطالعه حذف می‌شدند. همچنین مقالاتی که متن کامل آن‌ها به زبان انگلیسی و یا فارسی نبودند از بررسی خارج گردیدند.

یافته ها

بر اساس نتایج گزارش‌شده از مطالعات مختلف، PCR-CTPP می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش PCR-RFLP باشد؛ زیرا مرحله هضم آنزیم برش دهنده دیگر لازم نیست و در زمان و هزینه صرفه جویی می شود. روش PCR-CTPP نیازی به تجهیزات خاصی ندارد و در یک تک واکنش و تنها با مقدار کمی از مواد مصرفی استاندارد PCR انجام می شود(۱۹). از معایب این روش می توان به تکثیر نابرابر DNA در سیکل‌های آخر PCR اشاره کرد که احتمالاً دلیل آن دماهای ذوب مختلف در چهار پرایمر استفاده شده در این تکنیک باشد(۱۵). نتایج نشان می دهد برای کارایی بیشتر و تکرارپذیری روش CTPP باید با استفاده از الگوریتم و نرم افزارهای اختصاصی طراحی پرایمر، به اختصاصیت و یکسانی دماهای ذوب پرایمرهای طراحی شده توجه کرد.

بحث

به‌طور کلی روش PCR-CTPP با تکنیک amplification refractory mutation system–polymerase chain (ARMs) متفاوت است. آزمایش ARMS شامل دو واکنش مکمل است که هر کدام با استفاده از DNA الگوی یکسانی انجام می شود. اولین واکنش حاوی یک پرایمر ARMS وابسته به الل برای توالی DNA طبیعی است و نمی‌تواند DNA جهش یافته را در یک مکان مشخص تکثیر کند. به طور مشابه، واکنش دوم حاوی یک پرایمر خاص جهش یافته است و نمی‌تواند DNA طبیعی را تکثیر کند. هر

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-05]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.121]

دو واکنش حاوی یک پرایمر معمولی PCR و همچنین یک جفت آغازگر کنترل داخلی هستند که ناحیه متفاوتی از ژنوم را با هم تکثیر می‌کنند(۲۵). اگرچه به‌طور کلی روش PCR-CTPP شبیه روش تتراآرمز است که از دو جفت پرایمر استفاده می شود(۲۶). در روش PCR-CTPP، DNA الگو، آنزیم پلیمراز، میکس نوکلئوتیدها، بافر و دو جفت پرایمر در یک میکروتیوپ مخلوط و پس از تکثیر در دستگاه ترموسایکلر، نمونه‌های تکثیر شده بر روی ژل آگارز بارگذاری و الکتروفورز می شوند و بر اساس اندازه قطعات می توان ژنوتیپ هرSNP را مشخص کرد(۲۴). در این روش تعیین ژنوتیپ، از چهار پرایمر (آغازگر) دریک واکنش PCR استفاده می شود، دو آغازگر داخلی که اختصاصی پلی مورفیسم و دو آغازگر خارجی که برای آلل های نوع وحشی و جهش یافته مشترک هستند. به طور مثال اگر به صورت قراردادیX و Y دو الل یک SNP باشند به منظور بررسی آن در یک نمونه چهار پرایمر طراحی شده به‌صورت زیر عمل می‌کنند. پرایمرهای F1 و R1 برای الل X و پرایمرهای F2 و R2 برای الل Y. در پرایمر R1 انتهای 3’ پرایمر با الل X و انتهای 3’ پرایمر F2 با الل Y مکمل می‌گردد. در مجموع نوکلئوتید انتهایی R1 وF2 باید در موقعیت SNP باشند. پرایمرهایF1 و R2 در واکنش PCR محصول C را تکثیر می‌نمایند که به‌عنوان کنترل واکنش است و همیشه تکثیر می‌گردد (شکل ۱). همچنان که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد اگر ژنوتیپ XX باشد قطعات A و C و اگر ژنوتیپ YY باشد قطعات B و C تکثیر می شود. همچنین اگر ژنوتیپ پلی مورفیسم مورد نظر هتروزیگوت باشد قطعات A و B و C تکثیر می‌گردد(۲۷).

روشPCR-CTPP پرکاربرد، سریع، ساده و البته کم هزینه برای تعیین ژنوتیپ پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی است و برای مطالعهSNP ژن‌های مختلف در بسیاری از بیماری ها استفاده شده است(۲۴). در مطالعات گذشته دقت و تکرارپذیری روش PCR-CTPP برای بررسی پلی مورفیسم های مختلف از جمله IL-1B, ALDH2, FUT2, XRCC1, NQO1 C609T (Pro187Ser)وDRD2, L-myc با مقایسه نتایج با تکنیک های RFLP و توالی یابی DNA تائید شده است(۲۸, ۲۹). بسیاری از SNP ها با این روش تعیین ژنوتیپ و ارتباط آن ها با مسیرهای متابولیسمی (۳۰) و یا پاتوژنز و خطر بیماری‌ها بررسی شده است، مانند بررسی ارتباط اینترلوکین 1B(-C 31T) با رفتارهای سیگار کشیدن(۳۱)، اینترلوکین۲ (-330G) با آتروفی معده ناشی از هلیکوباکترپیلوری(۳۲)،گیرنده بتا۲ آدرنرژیک(Gln27Glu) با بیماری شدید عروق کرونر(۳۳)، آلدهیددهیدروژناز۲ (ALDH2) با خطر سرطان مری (۳۴)، MTHFR-C677T با بیماری آلزایمر(۳۵) استفاده شده است(۳۵). Niruri و همکاران در سال ۲۰۲۱، روش PCR-CTPP بهینه را با موفقیت برای تعیین واریانت های ژن CYP2C9 rs1057910 گزارش کردند. در این مطالعه نتایج تعیین ژنوتیپ با روش PCR-CTPP با توالی یابی DNA مطابقت داشت(۳۰). نتایج مطالعه Tamura و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که PCR-CTPP می‌تواند یکی از روش‌های جایگزین برای تعیین ژنوتیپ VKORC1 G-1639Aو CYP2C9 A1075C برای تعیین اثرات وارفارین در جمعیت کشور ژاپن باشد(۳۶). در مطالعه Tamuraو همکاران (۲۰۱۴) ، فراوانی الل های VKORC1 G-1639A و CYP2C9 A1075C با استفاده از روش PCR-CTPP با موارد گزارش شده در داده‌های HapMap از نظر صحت تائید شد. هر دو SNP برای ۴۳۶ نمونه با روش DigiTag2 تکرار شدند؛ لذا این نتایج ثابت کرده است که PCR-CTPP برای ژنوتیپ VKORC1 G-1639A و CYP2C9 A1075C قابل استفاده است(۳۶). در مطالعه Darvishi و همکاران (۲۰۱۶) برای اولین بار کارایی روش

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-05]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.121]

PCR-CTPP را برای بررسی پلی مورفیسم 1031- (rs1799964) در ناحیه تنظیمی پروموتر ژن TNF-α در بیماران پریودنتیت مهاجم بررسی نمودند. در این مطالعه گزارش شد که روشPCR-CTPP روشی مناسب و دقیق برای بررسی پلی مورفیسم rs1799964 است به طوری که فراوانی این پلی مورفیسم در جمعیت کشور ایران با جمعیت سایر کشور ها یکسان بود (۱۲).

روش CTTP قابلیت آنالیز هم‌زمان چند پلی مورفیسم را دارد و محققین در مطالعات گذشته از CTPP چندگانه استفاده کرده‌اند. Kawai و همکاران در سال ۲۰۰۵، PCR-CTPP چهارگانه را برای تعیین ژنوتیپ هم‌زمان چهار پلی مورفیسم عملکردی آنزیم‌های متابولیزه کننده سرطان، CYP1A1 Ile462Val، GSTM1 null، GSTT1 null وNQO1 C609T گزارش کردند، نتایج آن‌ها نشان داد که این پلی مورفیسم ها ارتباط قابل توجهی با خطر سرطان دارند و پیشنهاد کردند که با توجه به دقت و ارزان بودن روش CTPP، از این روش برای بررسی پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی به منظور پیشگیری از سرطان به ویژه در مناطق آسیایی و اقیانوسیه که روش‌های تعیین ژنوتیپ گران قیمت به سختی در دسترس است، استفاده شود(۳۷). در مطالعه Kawase و همکاران در سال ۲۰۰۳، PCR-CTPP سه‌گانه را برای تعیین ژنوتیپ هم‌زمان سه پلی مورفیسم عملکردی آنزیم های NQO1 C609T، GSTM1 null و GSTT1 null معرفی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد همه این پلی مورفیسم ها ارتباط معنی‌داری با خطر سرطان دارند(۳۸). Tamakoshi و همکاران در سال ۲۰۰۳ (۳۹) ، پلی مورفیسم زیر واحد بتای الکل دهیدروژناز Arg47His (ADH2) و آلدهید دهیدروژناز۲ Glu487Lys (ALDH2) و همچنین Atsuta و همکاران در سال ۲۰۰۵ پلی مورفیسم های IL-1B C-وCYP2E1 RsaI/IL-2 T-330G 31T/TNF-A T-1031C با واکنش هم‌زمان CTPP دوگانه تعیین ژنوتیپ شدند(۴۰). اگرچه نتایج مطالعات انجام شده برای بررسی پلی مورفیسم های ژنتیکی با روش PCR-CTPP سه گانه با روش‌های دیگری از جمله روش تعیین توالی (سکونسینگ) تائید نشده‌اند.

طراحی پرایمر برای این روش مانند روش معمول PCR نیازمند در نظر گرفتن محدودیت‌های معمول طراحی پرایمر مانند طول آغازگر، تفاوت طول جفت آغازگر، طول محصول PCR، نسبتGC، دمای ذوب، وجود دیمرها، ساختار سنجاق سر و اختصاصیت پرایمرها است. در مطالعه Chuang و همکاران (۲۰۱۵)، یک روش مبتنی بر MA (الگوریتم ممتیک) برای امکان طراحی مجموعه های پرایمرهای CTPP پیشنهاد شده است(۱۴). در روش طراحی آغازگر CTPP مبتنی برMA دماهای ذوب بحرانی و انواع ارزیابی محدودیت‌های رایج طراحی پرایمر را فراهم می‌کند تا به محققان در دستیابی به مجموعه‌های آغازگر CTTP کمک کند. الگوریتم MA-CTPP در JAVA راه‌اندازی شده و لینک ورود آن (http://bio.kuas.edu.tw/ma-ctpp) به‌صورت رایگان در دسترس است(۱۴). یکی از نکات کلیدی در طراحی پرایمر تنظیم دمای ذوب پرایمر است. روشCTPP تنها تفاوت کمی در دمای ذوب چهار آغازگر را تحمل می‌کند. به طوری که افزودن یک نوکلئوتید به پرایمر، دمای ذوب(Tm) آن را تغییر داده و باعث ایجاد اختلال در بالانس شدت باندهای PCR می‌شود. برای تنظیم پرایمر، دمای ذوب باید برای چهار پرایمر یکسان باشد اگرچه Tmمحاسبه شده بر اساس تعداد نوکلئوتیدها و درصد ترکیب بازهای GC همیشه تعیین کننده اتصال دقیق پرایمر به DNA الگو نیست. مورد دیگری که در روش CTPP باید توجه شود تکثیر متوازن باندهای PCR است. اگر مقدار تولید DNA باند C (شکل۱) از نظر مقدار بین دو آلل به طور بارزی متفاوت باشد و عدم تعادل با تغییر دمای PCR اصلاح نشود، می‌توان با افزودن یا حذف نوکلئوتیدها در برخی پرایمرها مشکل را اصلاح کرد(۱۱)(۲۳). با این حال

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-05]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.121]

گاهی در PCR تکثیر نامتوازن باندهای اختصاصی آلل اتفاق می افتد. به این منظور می توان از روش بهینه شده آن بنام one primer amplification of PCR-CTPP products (OPA-CTPP) استفاده کرد که در این روش با اتصال یک توالی عمومی (مشترک) به انتهای '۵ هر دو جفت پرایمرها و اضافه کردن پرایمر دیگری با همان توالی عمومی در PCR استفاده کرد؛ لذا در مجموع پنج آغازگر مختلف در یک میکروتیوب PCR اضافه خواهد شد. این روش برای مطالعه پلی مورفیسم A/G ژن (rs662) paraoxonase1 (PON1) Gln192Arg استفاده شده است(۱۵). به منظور تکثیر متوازن باندها در روشCTPP، روش بهینه شده برای تشخیص پلی مورفیسم Arg48His در ژن ADH1B توسط Jiang و همکاران در سال ۲۰۱۶ معرفی شد(۱۹). همچنان که ذکر شد نوکلئوتید ′3 در پرایمرهای اختصاصی الل متفاوت است؛ ولی در این روش نوکلئوتید موقعیت ′3 آغازگرهای بیرونی نیز (علاوه بر آغازگرهای داخلی وابسته الل) تغییر دادند؛ لذا از تقویت تکثیر DNA کنترل غیر اختصاصی داخلی جلوگیری کرد و باعث توازن در تکثیر باندها شد. نتایج حاصل از این نوع بهینه شده PCR-CTPP با تعیین توالی Sanger تأیید شد(۱۹).

همچنین در فرآیند بهینه سازی روش PCR-CTPP، تعیین نسبت مطلوب غلظت پرایمرها نیز ضروری است.

در مطالعه Niruri و همکاران (۲۰۲۱)، نسبت مطلوب پرایمرها را در روش PCR CTPP به منظور بررسی پلی مورفیسم CYP2C9(rs1057910) در جمعیت اندونزی بهینه‌سازی کردند(۳۰). نتایج آنان نشان داد که باند آغازگرهای داخلی ضعیف ترین باند بود و پیشنهاد کردند نسبت غلظت آغازگر بیرونی و داخلی بهینه‌سازی شود. در مطالعه Niruri و همکاران، باند بهینه برای CYP2C9*1*1در نسبت آغازگرهای خارجی (F1-R2) به داخلی (F2-R1) ۲:۱ بود(۳۰). ازآنجاکه دو نوکلئوتید موجود در انتهای '3 آغازگرهای داخلی با الگو ناسازگار هستند؛ لذا ممکن است باندهای مربوطه ضعیف باشند؛ بنابراین اضافه کردن مواد افزودنی مانند dimethyl sulfoxide(DMSO) ، betaine و ammonium sulfate (AMS) و همچنین استفاده از برنامه touchdown PCR به منظور افزایش عملکرد و اختصاصیت PCR راه‌حل‌های مناسبی برای این مشکلات است (جدول ۲). Dehghan Colagari و همکاران در سال ۲۰۱۸ از این روش PCR-CTPP بهینه شده برای بررسی ارتباط THFR-C677T با خطر بیماری آلزایمر استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد تعیین ژنوتیپ های SNP فوق الذکر را می توان با روش PCR-CTPP بهینه سازی شده که روشی قابل اعتماد است انجام داد (۳۵).

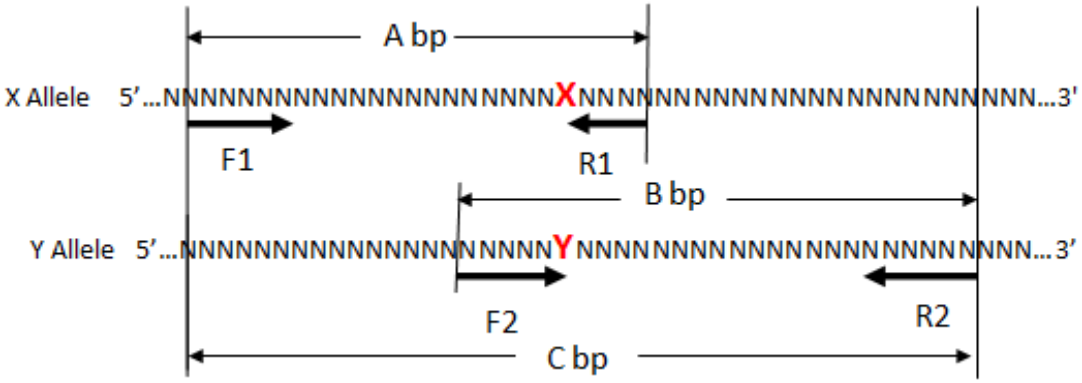
جدول۲. استراتژی‌های بکار رفته برای بهینه سازی روش PCR-CTPP

ردیف	نوع عملکرد	استراتژی	منبع

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-05]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.121]

۱	طراحی پرایمر	-طراحی پرایمر های اختصاصی با نرم افزارهایی مبتنی بر الگوریتم MA-CTPP: بهینه سازی دماهای ذوب (یکسان بودن دماهای ذوب پرایمرها) و ارزیابی محدودیت‌های رایج طراحی پرایمر،	(۱۴)
۲	تکثیر متوازن باندهای اختصاصی آلل	استفاده از روش OPA-CTPP تعیین نسبت مطلوب غلظت پرایمرها بهینه سازی نسبت غلظت آغازگر بیرونی و داخلی: نسبت آغازگرهای خارجی (F1-R2) به داخلی (F2-R1) ۲:۱	(۱۵) (۳۰)
۳	تقویت باند های اختصاصی الل	اضافه کردن مواد افزودنی مانند dimethyl sulfoxide(DMSO)، betaine و ammonium sulfate (AMS) استفاده از برنامه touchdown PCR	(۳۵)



شکل۱. شماتیک تکنیک PCR-CTPP با دو جفت پرایمر(۲۴). اگر ژنوتیپ XX باشد قطعات A و C و اگر ژنوتیپ YY باشد قطعات B و C تکثیر می شود. اگر ژنوتیپ پلی مورفیسم مورد نظر هتروزیگوت باشد قطعات A و B و C تکثیر می گردد.

نتیجه‌گیری

اگرچه روش‌های بسیاری از قبیل PCR-RFLP، Microarray، Taq Man و... برای تعیین ژنوتیپ SNP ها وجود دارد؛ ولی روش PCR-CTPP، روشی مناسب و ساده است که از نظر زمان و هزینه نیز مقرون به صرفه می باشد. اگرچه برای کارایی بیشتر و تکرارپذیری این روش پیشنهاد می شود با الگوریتم و نرم افزارهای اختصاصی طراحی پرایمر برای روش CTPP، به اختصاصیت و یکسانی دماهای ذوب پرایمرهای طراحی شده توجه کرد. همچنین استراتژی های بهینه سازی نسبت غلظت پرایمرهای داخلی و خارجی، اضافه کردنی مواد افزودنی تقویت کننده تکثیر به مخلوط واکنش PCR و استفاده از برنامه touchdown نیز پیشنهاد می شود.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی بابت اجازه استفاده از منابع الکترونیک تقدیر و تشکر می‌گردد. این مقاله مروری است و نیازمند کد اخلاق در پژوهش نیست و هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه‌ها تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند. همچنین برای مقاله از جایی گرنت جذب نشده است.

منابع

1.Yang CH, Cheng YH, Chuang LY, Chang HW. Confronting two-pair primer design for enzyme-free SNP genotyping based on a genetic algorithm. BMC bioinformatics. 2010;11(1):1-11.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-05]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.121]

2.Ghaheri M, Kahrizi D, Yari K, Babaie A, Suthar R, Kazemi E. A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. Cellular and Molecular Biology. 2016;62(3):120-4.
3.Goldfeder RL, Wall DP, Khoury MJ, Ioannidis JP, Ashley EA. Human genome sequencing at the population scale: a primer on high-throughput DNA sequencing and analysis. American journal of epidemiology. 2017;186(8):1000-9.
4.Moradi MT, Yari K, Khodarahmi R. A novel, efficient, fast and inexpensive DNA extraction protocol from whole blood applicable for studying drug-DNA interaction. The Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences. 2014;3(1):80-4.
5.Koopaee HK, Koshkoiyeh AE. SNPs Genotyping technologies and their applications in farm animals breeding programs. Brazilian Archives of Biology and Technology. 2014;57:87-95.
6.Udoh LI, Willie P, Uzoebo C. Single Nucleotide Polymorphisms: A Modern Tool to Screen Plants for Desirable Traits. Plant Breeding-Current and Future Views: IntechOpen; 2021.
7.Ismail S, Essawi M. Genetic polymorphism studies in humans. Middle East Journal of Medical Genetics. 2012;1(2):57-63.
8.Jalilvand A, Yari K, Aznab M, Rahimi Z, Salahshouri Far I, Mohammadi P. A case-control study on the SNP309T→ G and 40-bp Del1518 of the MDM2 gene and a systematic review for MDM2 polymorphisms in the patients with breast cancer. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2020;34(12):e23529.
9.Zhang J, Yang J, Zhang L, Luo J, Zhao H, Zhang J, et al. A new SNP genotyping technology Target SNP-seq and its application in genetic analysis of cucumber varieties. Scientific reports. 2020;10(1):1-11.
10.Onda Y, Takahagi K, Shimizu M, Inoue K, Mochida K. Multiplex PCR targeted amplicon sequencing (MTA-Seq): simple, flexible, and versatile SNP genotyping by highly multiplexed PCR amplicon sequencing. Frontiers in plant science. 2018;9:201.
11.Chen K, Zhou Y-x, Li K, Qi L-x, Zhang Q-f, Wang M-c, et al. A novel three-round multiplex PCR for SNP genotyping with next generation sequencing. Analytical and bioanalytical chemistry. 2016;408(16):4371-7.
12.Yang S, Fresnedo-Ramírez J, Wang M, Cote L, Schweitzer P, Barba P, et al. A next-generation marker genotyping platform (AmpSeq) in heterozygous crops: a case study for marker-assisted selection in grapevine. Horticulture research. 2016;3(1):1-12.
13.Guo Z, Wang H, Tao J, Ren Y, Xu C, Wu K, et al. Development of multiple SNP marker panels affordable to breeders through genotyping by target sequencing (GBTS) in maize. Molecular Breeding. 2019;39(3):1-12.
14.Chuang LY, Cheng YH, Yang CH. PCR-CTPP design for enzyme-free SNP genotyping using memetic algorithm. IEEE transactions on nanobioscience. 2015;14(1):13-23.
15.Yin G, Mitsuda Y, Ezaki T, Hamajima N. A new PCR method: one primer amplification of PCR-CTPP products. Molecular biotechnology. 2012;52(2):180-3.
16.Suratannon N, van Wijck RT, Broer L, Xue L, van Meurs JB, Barendregt BH, et al. Rapid low-cost microarray-based genotyping for genetic screening in primary immunodeficiency. Frontiers in immunology. 2020;11:614.
17.Russo G, Zegar C, Giordano A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. Oncogene. 2003;22(42):6497-507.
18.Pavan S, Delvento C, Ricciardi L, Lotti C, Ciani E, D'Agostino N. Recommendations for choosing the genotyping method and best practices for quality control in crop genome-wide association studies. Frontiers in Genetics. 2020;11:447.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-05]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.121]

19.Jiang S, Tong Y, Zhao R, Xiong G, Qiao B, Li Y. An improved PCR-CTPP assay for the detection of ADH 1B Arg48His polymorphism. Journal of clinical laboratory analysis. 2018;32(2):e22268.
20.Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genetics selection evolution. 2002;34(3):275-305.
21.Xu F, Wang W, Wang P, Li MJ, Sham PC, Wang J. A fast and accurate SNP detection algorithm for next-generation sequencing data. Nature communications. 2012;3(1):1-9.
22.Siyadat P, Ayatollahi H, Barati M, Sheikhi M, Shahidi M. High Resolution Melting Analysis for Evaluation of mir-612 (Rs12803915) Genetic Variant with Susceptibility to Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. Reports of Biochemistry & Molecular Biology. 2021;9(4):385.
23.Hamajima N. PCR-CTPP: a new genotyping technique in the era of genetic epidemiology. Expert review of molecular diagnostics. 2001;1(1):119-23.
24.Darvishi E, Aziziaram Z, Yari K, Dehbaghi MB, Kahrizi D, Karim H, et al. Lack of association between the TNF-α-1031genotypes and generalized aggressive periodontitis disease. Cellular and Molecular Biology. 2016;62(11):63-6.
25.Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. Current protocols in human genetics. 1995;7(1):9.8. 1-9.8. 12.
26.Lajin B, Alachkar A, Sakur AA. A quadruplex tetra-primer ARMS–PCR method for the simultaneous detection of TP53 Arg72Pro, IVS3 16 bp Del/Ins and IVS6+ 62A> G, and NQO1 C609T polymorphisms. Gene. 2012;504(2):268-73.
27.Hamajima N, Saito T, Matsuo K, Kozaki Ki, Takahashi T, Tajima K. Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers for polymorphism genotyping. Japanese Journal of Cancer Research. 2000;91(9):865-8.
28.Hamajima N, Saito T, Matsuo K, Tajima K. Competitive amplification and unspecific amplification in polymerase chain reaction with confronting two-pair primers. The Journal of molecular diagnostics. 2002;4(2):103-7.
29.Hamajima N, Matsuo K, Saito T, Tajima K, Okuma K, Yamao K, et al. Interleukin 1 polymorphisms, lifestyle factors, and Helicobacter pylori infection. Japanese journal of cancer research. 2001;92(4):383-9.
30.Niruri R, Ardyanto T, Pangastuti A, Kusherwati D, editors. Two-Pair Primers PCR-CTPP Optimization to Identify rs1057910 CYP2C9 Gene Variants in Surakarta. Journal of Physics: Conference Series; 2021: IOP Publishing.
31.Katsuda N, Hamajima N, Tamakoshi A, Wakai K, Matsuo K, Saito T, et al. Helicobacter pylori seropositivity and the myeloperoxidase G-463A polymorphism in combination with interleukin-1B C-31T in Japanese health checkup examinees. Japanese journal of clinical oncology. 2003;33(4):192-7.
32.Togawa S, Joh T, Itoh M, Katsuda N, Ito H, Matsuo K, et al. Interleukin-2 gene polymorphisms associated with increased risk of gastric atrophy from Helicobacter pylori infection. Helicobacter. 2005;10(3):172-8.
33.Abu-Amero KK, Al-Boudari OM, Mohamed GH, Dzimiri N. The Glu27 genotypes of the beta2-adrenergic receptor are predictors for severe coronary artery disease. BMC Medical Genetics. 2006;7(1):1-5.
34.Yang SJ, Wang HY, Li XQ, Du HZ, Zheng CJ, Chen HG, et al. Genetic polymorphisms of ADH2 and ALDH2 association with esophageal cancer risk in southwest China. World journal of gastroenterology: WJG. 2007;13(43):5760.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-05]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.121]

35.Colagari FD, Colagar AH, Zamani MR. Human MTHFR-C677T gene transition increased risk of Alzheimer disease: a case-control study which performed by optimized PCR-CTPP method. Comparative Clinical Pathology. 2018;27(4):879-85.
36.Tamura T, Katsuda N, Hamajima N. A PCR method for VKORC1 G-1639A and CYP2C9 A1075C genotyping useful to warfarin therapy among Japanese. SpringerPlus. 2014;3(1):1-6.
37.Kawai S, Nishio K, Nakamura S, Sekido Y, Niwa T, Hamajima N. Multiplex PCR with confronting two-pair primers for CYP1A1 Ile462Val, GSTM1, GSTT1, and NQO1 C609T. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2005;6(3):346.
38.Kawase H, Hamajima N, Tamakoshi A, Wakai K, Saito T, Tajima K. Triplex polymerase chain reactions with confronting two-pair primers (PCR-CTPP) for NQO1 C609T, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms: a convenient genotyping method. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2003;4(1):67-70.
39.Tamakoshi A, Hamajima N, Kawase H, Wakai K, Katsuda N, Saito T, et al. Duplex Polymerase Chain Reaction with Confronting Two-Pair Primers (PCR–CTPP) for Genotyping Alcohol Dehydrogenase B Subunit (Adh2) and Aldehyde Dehydrogenase 2 (Aldh2). Alcohol and Alcoholism. 2003;38(5):407-10.
40.Atsuta Y, Kawase H, Hamajima N, Nishio K, Niwa Y, Tanaka D, et al. Use of Duplex PCR-CTPP Methods for CYP2E1 Rsa I/IL-2 T-330G and IL-1B C-31T/TNF-A T-1031C Polymorphisms. Molecular Diagnosis. 2005;9(2):89-94.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-05]

[DOI: 10.52547/sjku.27.4.121]