طراحی پرایمر و تعیین نژادهای ویروس، شیوه نوین و سریع در شناسایی بیماری های ویروسی توتون

فاطمه زینتی فخراباد[۱] ، سعید نصرالله نژاد[۲]، ، میثم تقی نسب[3]

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ،۲،۳ عضو هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

Zinati_fateme@yahoo.com

چکیده

موفقیت PCR به میزان زیادی وابسته به طراحی پرایمر بر نکاتی مانند دمای ذوب، طوله پرایمر، درصد CG و تکمیل بهینه سازی تولید PCR تاکید دارد . طراحی پرایمر معمولا برای دو منظور انجام می شود: شناسایی SNPs,CNVs یا آزمایشاتی مانند PCR-RFLP که برروی DNA انجام می شود و برای انجام RT-PCR و بررسی RNA سلولها. در این تحقیق به منظور شناسایی نژادهای ویروس وای سیب زمینی در مزارع توتون سطح استان گلستان اقدام به طراحی پرایمر ویروس وای سیب زمینی نمودیم. بدین منظور بااستفاده ازاطلاعات موجود در بانک جهانی ژن NCBI، تمام ایزوله های ویروس وای سیب زمینی (PVY) موجود درسطح جهان گردید و از طریق نرم افزار BioEdit اقدام به همردیف سازی ایزوله ها و طراحی پرایمر عمومی گردید. نتایج بدست آمده از استخراج RNA ویروس فوق، کارایی مناسب توالی های طراحی شده را بیان می دارد. طراحی پرایمرهای اختصاصی به منظور شناسایی سریع نژادهای ویروس وای سیب زمینی از گیاه توتون همچنان در دست بررسی است.

واژگان کلیدی : ویروس وای سیب زمینی، طراحی پرایمر، گیاه توتون

مقدمه

پرایمر کلید موفقیت یا عدم موفقیت واکنش PCR به شمار میرود. اگر پرایمرها به طور صحیح طراحی شده باشند، واکنش PCR منجر به تکثیر قطعه ای از cDNA می شود که با ناحیه هدف مولکول الگو مطابقت دارد. اگرپرایمرها به طور صحیح طراحی نشوند، واکنش باشکست روبه رو خواهد شد، در این حالت یا اصولا هیچ قطعه ای تکثیر نخواهد شد و یا اینکه قطعه یا قطعات اشتباهی تکثیر خواهد شد. از این رو باید به طراحی پرایمرها توجه زیادی کرد (آکالین، ۲۰۰۶). طراحی پرایمر با توالی مناسب کار مشکلی نیست. آنها باید با

توالی دو سر ناحیه هدف روی مولکول الگو مطابقت داشته باشند. البته هرپرایمر باید مکمل رشته الگو باشد تا هیبرید شدن صورت گیرد و انتهای ۳ پرایمرهای هیبرید شده نیز باید به طرف همدیگرباشند.روشها و نرم افزارهای مختلفی برای طراحی پرایمر وجود دارد که هدف همه آنها ایجاد آغازگرهایی است که بتواند واکنش PCR را به بهترین شکل به پیش ببرد(کیم، ۲۰۰٤). در طراحی پرایمرها اولین موضوع مهمی که باید به آن اشاره نمود طول پرایمر است. اگرپرایمرها خیلی کوتاه باشند ممکن است با بخش های غیر هدف هیبرید شوند و سبب تکثیر محصولات نا خواسته شوند. البته برای سهولت کار نیز نمیتوان از پرایمرهای بسیاز بلند استفاده نمود، زیرا طول پرایمر بر سرعت هیبرید شدن آن با DNA الگو اثر میگذارد. به طوری که پرایمرهای بلندتر با سرعت کمتری هیبرید میشوند(بایات، ۲۰۰۲).

مواد و روش ها

پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق بر اساس آنالیز هم ردیف سازی توالی مربوط به ٦٥ ایزوله و سویه از ویروس Y سیب زمینی (که از بانک جهانی ژن NCBI دانلود شده بود) و با استفاده از نرم افزار BioEdit طوری طراحی گردید که بتوانند تمام ایزوله های احتمالی را تکثیر کنند. با توجه به اینکه این ویروس از گروه ویروسهای دارای دم پلیA میباشد، سعی شد توالی یابی دورتر از این ناحیه که در انتهای ژنوم واقع است، انجام پذیرد.سعی برآن شد که طول متوسط هر پرایمر بین ۱۸-۳۰ باز باشد تا مشکلات حاصل از بلندی یا کوتاهی پرایمر در حین PCR ایجاد نشود.پرایمر ها طوری طراحی شدند که در انتها ۳ به نوکلئوتید Cیا G ختم شوند،از طرفی دمای Tm پرایمرهای طراحی شده نیز نزدیک به هم و حدود ۵۵ بود. که در نهایت توالی این پرایمر های طراحی شده به شرح زیر می باشد :

PVY1F:7861-CAA CTC CAG ATG GAA CAA TTG-7882

PVY1R: 8858-CCA TTC ATC ACA GTT GGC-8875

PVY2F: 8858-GCC AAC TGT GAT GAA TGG-8875

PVY2R:9298-GTAGAG TAT GCA TAC TTG GAG-9318

برای تکثیر RNA از آغازگرهای عمومی ویروس وای سیب رمینی استفاده شد که سبب تکثیر همه نژادهای PVY شده و وجود این ویروس را برای ما به اثبات میرساند.

نتایج و بحث:

نتایج استفاده از پرایمرهای طراحی شده نشان داد که این توالی ها دارای توانایی بسیار مناسبی برای تولید cDNA از ژنوم ویروس Yسیب زمینی که به صورت RNAاست دارا میباشد و نیز وجود این ویروس را در نمونه های مورد بررسی به اثبات رساند. برای

شناسایی این ویروس و سایر پاتوژنها روشهای مختلفی وجود دارد که در حال حاضر شناسایی توالی ژنوم و پروتئین ها از کارامدترین و سریعترین روشها بشمار میرود (پرسون، ۲۰۰۰). اگر چه در بسیاری تحقیقات استفاده از پرایمر های اختصاصی مد نظر بوده است، اما در تحقیق فوق، طراحی پرایمر عمومی بدلیل تکثیر تمامی نژادهای ویروس باعث میشود بتوان در آزمایشات دیگر برای طراحی پرایمرهای اختصاصی با اطمینان بشتری اقدام به شناسایی ویروس نمود. باید توجه داشت که در طراحی پرایمرها، طول رشته طراحی شده و نیز دمای ذوب آغازگرها و غلظت آنها نقش تعیین کننده ای را در پیشرفت و موفقیت روند آزمایشات PCR برعهده دارد. همچنین در روند طراحی پرایمر مشخص شد که چنانچه بنا به دلایلی از جمله بلند بودن طول پرایمر ، پرایمر دایمر ایجاد شود میتوان مشکل فوق را با کاهش غلظت پرایمرو آنزیم تا حدودی رفع نمود.

منابع :

[1] Alkaline PK. Introduction to bioinformatics. Mol Nut Food Res. 2006 Jul;50(7):610-9.

[2] Redshirt Bayar. Science, medicine, and the future bioinformatics, BMJ 2002;324:1018-1022 (27 April).

[3] Kim SS. Introduction of bioinformatics methods for the gene function analysis, Korean J Hepatic. 2004 Mar;10(1):11-21.

[4] Person B. Bioinformatics in protein analysis. EXS. 2000;88:215-31.

Design primer and detection of virus strains, new and rapidly method for identifying the tobacco virus Disease.

F.Zinati fakhrabad , S.Nasrollahnejad and M. Taghinasab

Dep. of Plant Protection Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

Zinati_fateme@yahoo.com

Abstract :

The success of the polymerase chain reaction (PCR) is highly dependent on primer design. Commonly used primer design programs rely upon a core set of parameters such as melting temperature, primer length, GC content, and complementarily to optimize the PCR product. Usually primer design use for two scope: identity CNVs and SNPs or experiment as PCR- RFLP on DNA and for do RT-PCR and survey RNA cells. For this aim using NCBI data, the identity all PVY strains existing in world were downloaded. Primers were designed using BioEdit software. Result of RNA extraction and subsequent RT-PCR showed that the designed primers had desirable efficacy. We are going to design new specific PVY primers to be able to rapidly identifying the PVY strains on tobacco.

Keywords: PVY, Primer design, plant tobacco