گزارش کوتاه

تشخیص ژنوم روتاویروس با روش جدید رنگ‌آمیزی نیترات نقره

الهام احمدی[۱]، دکتر حوریه سلیمان جاهی*[۲]، دکتر علی تیموری[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ویروس شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس.

۲- دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس. ۳- استادیار گروه ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز.

چکیده

زمینه و هدف : *روتاویروس‌ها عضو خانواده رئوویرویده و دارای ژنوم RNA دو رشته‌ای بوده و مهم‌ترین عامل گاستروانتریت در نوزادان و کودکان زیر سه سال است. این مطالعه به منظور ارزیابی تشخیص ژنوم روتاویروس با دو روش رنگ‌آمیزی تغییر شکل‌یافته نیترات نقره با استفاده از الکتروفورز ژل‌پلی‌آکریل‌آمید در مقایسه با رنگ‌آمیزی مرسوم نیترات نقره انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی روتاویروس از ٦ نمونه استاندارد کشت سلولی MA-104 آلوده با دو ویروس RV4 انسانی و RF گاوی به‌صورت مجزا استخراج شد. RNA روتاویروس از نمونه‌ها استخراج و برای تشخیص حضور ژنوم روتاویروس، الکتروفورز در ژل‌پلی‌آکریل‌آمید ۱۰درصد انجام گردید. با استفاده از رنگ‌آمیزی نیترات نقره باندهای RNA شناسایی شدند.*

یافته‌ها : *پس از کشت سلول و تکثیر ویروس، آثار تخریب سلولی به صورت کنده شدن سلول‌ها از بستر مشاهده شد که نشان‌دهنده تکثیر ویروس در سلول ها بود. حرکت الکتروفورتیک dsRNA روتاویروس سویه RF استاندارد براساس افزایش وزن مولکولی و حرکت در ژل‌پلی‌آکریل‌آمید از شماره ۱۱-۱ جداسازی شد و به صورت چهار قطعه سنگین، سه قطعه سه تایی، دو قطعه متوسط و دو قطعه کوچک با الگوی ژنومی گروه A روتاویروس تایید شد. رنگ‌آمیزی نقره و برآورد حساسیت روش با رقت های دوبرابری ژل مارکر مشاهده شد. کمترین رقت قابل اندازه‌گیری توسط این روش هفت پیکوگرم بود. همچنین با این روش در کمتر از ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی به‌طور مطلوب صورت گرفت.*

نتیجه‌گیری : *روش جدید رنگ‌آمیزی نقره قابلیت تشخیص الگوی ژنومی ویروس‌ها در مدت زمان کمتر و برای نمونه‌های در حد هفت پیکوگرم را داراست.*

کلید واژه‌ها : *روتاویروس ، الکتروفورز ژل‌پلی‌آکریل‌آمید ، رنگ آمیزی نیترات نقره*

* نویسنده مسؤول : دکتر حوریه سلیمان جاهی ، پست الکترونیکی **soleim_h@modares.ac.ir**

نشانی : تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس شناسی، تلفن و نمابر ۰۲۱-۸۲۸۸۳۵۶۱

وصول مقاله : ۹۱/۱۲/۹ ، اصلاح نهایی : ۹۲/۱۲/۱۲ ، پذیرش مقاله : ۹۳/۵/۲٦

مقدمه

روتاویروس مهم‌ترین عامل بیماری گاستروانتریت در نوزادان و کودکان زیر سه سال در سراسر دنیا و با بیش از ۶۰۰ هزار مرگ در کشورهای درحال توسعه است (۱و۲). ذرات ویروسی دارای سه لایه بیست وجهی با قطر ۱۰۰ نانومتر و حاوی ۱۱ قطعه ژنوم RNA دورشته‌ای هستند که براساس افزایش وزن مولکولی و حرکت در ژل‌پلی‌آکریل آمید از شماره ۱۱-۱ جداسازی می‌شوند (۱و۲). شناسایی اولیه روتاویروس متکی به میکروسکوپ الکترونی است؛ اما در مطالعات تخصصی‌تر از آزمون‌های متعدد شامل ایمنوالکترون میکروسکوپی (IEM)،آزمون ایمنوفلورسانس، الایزا، آزمون خنثی‌سازی، HI و ELISPOT، RT-PCR و نشان دادن باندهای تولید شده توسط ژل آگارز استفاده می‌شود (۱و۲). براساس تقسیم‌بندی ژنومی روتاویروس‌ها دارای هفت گروه از A تا G هستند. گروه A، B و C هم در انسان و هم در حیوانات یافت می‌شوند و بقیه گروه‌ها تنها در حیوانات وجود دارند (۱و۲). مطالعه ویروس در آزمایشگاه نیازمند کشت ویروس و تیمار توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک برای افزایش عفونت‌زایی ویروس است. اغلب روتاویروس‌ها به‌جز روتاویروس‌های گروه‌های A و C گاوی و انسانی در کشت سلولی رشد نمی‌کنند. برای تشخیص اولیه و تمایز گروه‌های روتاویروس هرکدام از این روش‌های تشخیصی نسبتاً پرهزینه بوده و نیازمند تجهیزات ویژه‌ای هستند (۱و۲). با توجه به اهمیت روتاویروس‌ها به عنوان عامل ویروسی اسهال در کودکان و نوزادان که از طریق واریانت‌های متعدد ژنومی (الکتروفوروتایپ) اتفاق می‌افتد؛ طراحی راه‌های تشخیصی حساس و در عین حال

سریع، حائز اهمیت است (۳و۴). با مطالعه حرکت الکتروفورتیک dsRNA در روتاویروس، الگوی ژنومی گروه A به‌صورت ۴ قطعه با وزن بالا، ۳ قطعه سه‌تایی، دو قطعه متوسط و دو قطعه کوچک است. الگویی غیر از این می‌تواند معرف روتاویروس پرندگان گروه A و یا غیر گروه A، نوترتیبی ژنتیکی که بین ویروس‌های گروه‌های یکسان رخ می‌دهد و یا بازآرایی قطعات در بیماران با نقص ایمنی و کودکانی با ایمنی ناکارآمد بدون علایم آلودگی با روتاویروس باشد. لذا مطالعه الگوی ژنومی روتاویروس از نظر تشخیص و ردیابی تنوع ژنومی و پروفایل‌های غیرطبیعی RNA که در شرایط خاص مانند نوترتیبی روتاویروس یافت می‌شود؛ از جنبه اپیدمیولوژیک مورد توجه است. الکتروفورز از شناخته شده‌ترین روش‌های آزمایشگاهی برای جداسازی بیومولکول‌ها است که در فار محلول انجام می‌شوند. برای تفکیک اسیدهای نوکلئیک معمولاً از ژل آگارز استفاده می‌شود. تهیه ژل و کار با آن به مراتب سریع‌تر و آسان‌تر از ژل پلی‌اکریل‌آمید است. معمولاً برای تفکیک قطعات با هدف بررسی کیفی و تفکیک از ژل آگارز استفاده می‌شود؛ اما برای تفکیک قطعات کوچک دو رشته‌ای و قطعات DNA یا RNA تک‌رشته‌ای و در صورت نیاز به تفکیک در حد یک نوکلئوتید و جداسازی مولکول‌هایی با طول حدود ۳۰-۲۰ نوکلئوتید از ژل پلی‌اکریل آمید استفاده می‌شود. در صورتی که نیاز به تفکیک اسیدهای نوکلئیک به صورت تک‌رشته‌ای باشد؛ از مواد واسرشت کننده نظیر اوره، فرمالدهید یا فرامید در ژل همزمان با الکتروفورز استفاده می گردد (۷-۵). با مطالعه در ژل‌های پلی‌آکریل آمید می‌توان تشابه و تنوع روتاویروس‌ها را مطالعه کرد. الکتروفورز و رنگ‌آمیزی ژل در نیترات نقره یک ابزار قوی برای نقشه‌برداری سایر شاخصه‌های بیولوژیکی و فنوتیپی برای تشخیص قطعات ژنومی است (۵و۶). عوامل متعددی از جمله میزان بار الکتریکی نمونه، اندازه و وزن نمونه، نوع ژل، نحوه آماده‌سازی و رنگ‌آمیزی در کیفیت الکتروفورز اثر دارند (۸و۹).

روش‌های مختلف رنگ‌آمیزی اسیدهای نوکلئیک از جمله فلورسانس، نقره، رنگ آلی قابل رویت با مزایا و معایب مختلف در حساسیت، امنیت و سرعت در تحقیقات استفاده می‌شود (۹و۱۰). با درنظر گرفتن حساسیت رنگ‌آمیزی نقره در سطح ۱-۰/۰۱ ng/band روشی حساس، نسبتاً ارزان و بسیار سریع برای تشخیص همه پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید است (۱۰-۸). با بالا بردن حساسیت روش، رفتار مولکول نیز در شرایط حساس‌تر تغییر می‌کند و لذا می‌توان ژن‌های تغییریافته را با دقت بیشتری مطالعه نمود. اصول و مراحل رنگ‌آمیزی نیترات نقره شامل حساس‌سازی پس از ثبوت و اشباع نقره و در نهایت گرفتن تصویر است که می‌تواند در بازه زمانی ۲ ساعت تا یک روز پس از پایان جداسازی الکتروفورتیک انجام شود (۱۰). در روش معمول رنگ‌آمیزی نیترات نقره، ژل در محلول رنگ‌آمیزی قرار داده می‌شود که پس از شستشو مرحله کاهش توسط محلول توسعه‌دهنده انجام می‌شود. این مطالعه به منظور ارزیابی تشخیص ژنوم روتاویروس با دو روش رنگ‌آمیزی تغییر شکل یافته نیترات نقره با استفاده از الکتروفورز ژل‌پلی‌آکریل‌آمید در مقایسه با رنگ‌آمیزی مرسوم نیترات نقره انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی روتاویروس از ۶ نمونه استاندارد کشت سلولی MA-104 (۵۰۰۰۰۰ سلول در هر نمونه) آلوده با دو ویروس RV4 انسانی و RF گاوی به‌صورت مجزا در آزمایشگاه گروه ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس در سال ۱۳۹۱ استخراج گردید.

کشت سلول و تکثیر ویروس

استرین‌های RV4 و RF از روتاویروس‌ها در کشت تک‌لایه سلول‌های جنینی کلیه میمون (MA104) و در حضور تریپسین (یک میکروگرم در میکرولیتر) کشت داده شدند (۱۱و۱۲).

استخراج و الکتروفورز برای تشخیص و ردیابی dsRNA

سلول‌های آلوده کشت سلولی پس از دو روز جمع‌آوری و دوبار منجمد و ذوب شدند. سانتریفیوژ در g ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه به منظور حذف بقایای سلولی انجام شد و ویروس‌های موجود در مایع رویی برای استخراج استفاده گردید. ابتدا RNA ویروس از ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره کشت سلولی براساس کیت Invitrogen ساخت فرانسه (PureLink® RNA Mini Kit) و براساس دستورالعمل سازنده آن استخراج شد. با این تفاوت که برای بازیافت بالاتر RNA ۳۰ میکرولیتر بافر شستشو از پیش گرم شده در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. SDS-PAGE با ژل slab (تخته‌ای) به طول ۱۰ سانتی‌متر و ضخامت ۰/۲ میلی‌متر انجام شد. ژل‌ها براساس روش لاملی در بافر تریس-گلیسین (بافر الکترود ۰/۲۵ M) pH=۸/۳ تریس هیدروکلراید، گلایسین ۰/۱۹۲ M، EDTA (۰/۰۰۱ M) آماده شد (۲و۷). سپس ۱۰ میکرولیتر از RNA در هر چاهک ژل بارگذاری شد و پس از رنگ‌آمیزی، الکتروفوروتایپ قابل رویت گردید. الکتروفورز طی ۱۴ ساعت با جریان ثابت ۲۰ میلی‌آمپر انجام شد.

رنگ‌آمیزی نقره

پس از الکتروفورز رنگ‌آمیزی با روش نیترات نقره انجام شد. بعد از رنگ‌آمیزی با محلول staining، ژل با آب دیونیزه دو تا سه بار شستشو داده شد تا زمینه ژل کمتر رنگ گیرد. در این مرحله برای شستشو به جای آب دیونیزه از محلول developer نیز می‌توان استفاده کرد و بلافاصله آن را با developer تازه جایگزین نمود.

شرایط ژل کنترل مطالعه، شبیه به شرایط الکتروفورز برای RNA روتاویروس است تا نتایج قابل تعمیم به آن باشد.

در روش معمول رنگ‌آمیزی نیترات نقره، ژل در محلول رنگ‌آمیزی به مدت ۲ ساعت و در حال تکان خوردن پیوسته (shaking) قرار داده می‌شود. سپس ژل‌ها سه مرتبه در آب مقطر و به مدت ۵ دقیقه شسته می‌شوند. مرحله کاهش که توسط افزودن محلول توسعه دهنده و با shaking انجام می‌شود. باندها در این مرحله ظاهر شده و این مرحله ادامه می‌یابد تا باندها کاملاً آشکار شوند. مرحله کاهش با جایگزینی محلول توسعه‌دهنده توسط اسیداستیک ۵ درصد، متوقف می‌شود. در موارد مثبت، باندهای جدا شده در ژل ظاهر می‌شوند (۷).

در این مطالعه با تغییراتی در روش قدیمی، ردیابی و شناسایی باندها RNA با استفاده از رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام شد. پس از الکتروفورز به‌طور همزمان ژل در یک محلول حاوی اتانول ۵ درصد، اسید نیتریک یک درصد و AgNO3 ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه ثابت و رنگ‌آمیزی شد و سپس محلول دور ریخته شد. این ژل به طور مختصر ۳ بار با آب چند بار تقطیر به مدت ۱۰ ثانیه شسته شد و سپس با یک محلول از سود ۱/۳ درصد، Na2CO3 ۰/۵ درصد و HCOH 30 ۰/۴ درصد به مدت ۲-۱ دقیقه تا ظاهر شدن باندهای رنگ‌آمیزی تیره به رنگ زرد روی پس‌زمینه ادامه یافت. سپس با محلول اتانول ۵ درصد و اسیدنیتریک یک درصد به مدت یک دقیقه رنگ‌آمیزی متوقف شد و محلول متوقف کننده دور ریخته شد (۹و۱۳و۱۴).

برآورد حساسیت رنگ‌آمیزی نقره

از یک مارکر مخلوط GeneRuler ™ 100bp Plus DNA Ladder (فرمنتاز) برای تعیین حساسیت کمی روش در ژل‌پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد استفاده شد. بدین منظور از رقت دو برابری نشانگر استفاده گردید. ژنوم RNA روتاویروس استخراج و غلظت آن مشخص و رقت سریالی دو برابر تهیه شد. به دلیل این که غلظت هر باند در الکتروفورز مثل مارکر مشخص نشده است؛ در این مرحله غلظت توتال RNA در نظر گرفته شد.

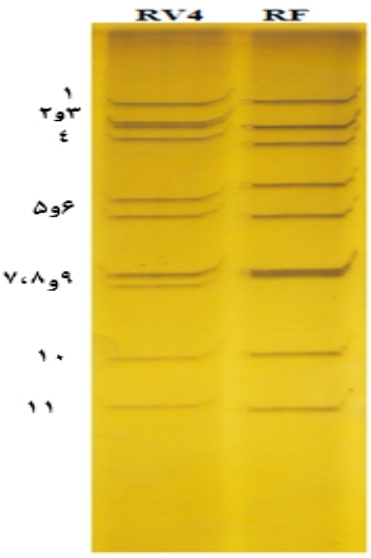
یافته‌ها

پس از کشت سلول و تکثیر ویروس، آثار تخریب سلولی به صورت کنده شدن سلول‌ها از بستر مشاهده شد که نشان‌دهنده تکثیر ویروس در سلول‌ها است (شکل یک).

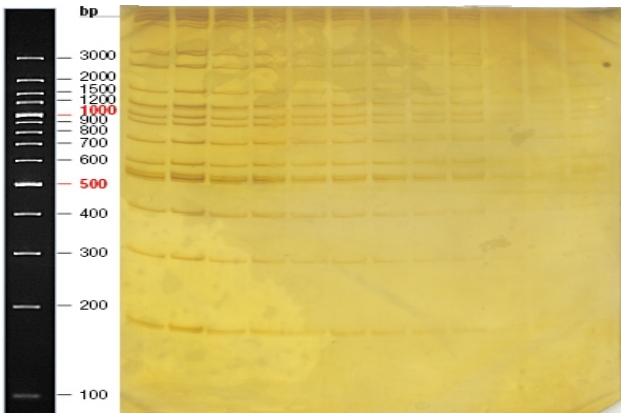
حرکت الکتروفورتیک dsRNA روتاویروس سویه RF استاندارد براساس افزایش وزن مولکولی و حرکت در ژل‌پلی‌آکریل‌آمید از شماره ۱۱-۱ جدا سازی شد و به‌صورت چهار قطعه سنگین، سه قطعه سه‌تایی، دو قطعه متوسط و دو قطعه کوچک با الگوی ژنومی گروه A روتاویروس تایید شد (شکل ۲). رنگ‌آمیزی نقره و برآورد حساسیت روش در شکل ۳ با رقت‌های دوبرابری ژل مارکر نشان داده شده است. کمترین رقت قابل اندازه‌گیری توسط این روش هفت پیکوگرم بود. همچنین با این روش در کمتر از ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی به طور مطلوب صورت گرفت.

در روش تغییریافته، ردیابی و شناسایی باندهای RNA در مدت زمان ۸ تا ۱۰ دقیقه و با حساسیت بالایی انجام شد.

شکل ۱ : نمایی از کشت MA104 آلوده به روتاویروس



شکل ۲ : الگوی الکتروفورزی روتاویروس گاوی RF و انسانی RV4 با الگوی طبیعی در ژل‌پلی‌آکریل‌آمید ۱۰ درصد



شکل ۳ : الگوی الکتروفورزی مارکر DNA

بحث

روش جدید رنگ‌آمیزی نقره با درنظرگرفتن حساسیت رنگ‌آمیزی نقره در سطح ng/band ۱-۰/۰۱ روشی حساس، نسبتاً ارزان و بسیار سریع برای تشخیص همه پروتئین و اسیدهای نوکلئیک در ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید است. کمترین رقت قابل اندازه‌گیری توسط این روش به منظور تشخیص الگوی ژنومی روتاویروس‌ها، هفت پیکوگرم بود. یکی از مزیت‌های این روش سرعت عمل آن بود که در کمتر از ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی به‌طور مطلوب امکان‌پذیر شد و در مقایسه با روش مرسوم قدیم که در مدت ۲ ساعت انجام می‌شود؛ در زمان کمتری قابل انجام است.

با توجه به این که در هر گونه روتاویروس الگوی الکتروفورتیک متفاوت است؛ لذا آنالیزهای ژنتیک و نیز تلاش در جهت درک بهتر ویژگی‌های قطعات ژنومی روتاویروس در تشخیص ایزوله‌های مختلف در عفونت‌های ترکیبی و مطالعه جنبه‌های اپیدمیو لوژیک آنها نقش به‌سزایی دارد. ژل الکتروفورز و روش معمول رنگ‌آمیزی نیترات نقره یکی از روش‌های مورد استفاده برای تشخیص ژنوم RNA روتاویروس و نیز برای مطالعه اپیدمیولوژی مولکولی این ویروس در بسیاری از تحقیقات است. این روش نه تنها در تشخیص استرین‌های متنوع درون گونه‌ای مفید است؛ بلکه در کشف انتقال بین‌گونه‌ای، تمایز گونه‌ها و نوترکیبی درون گونه‌ای مفید است. با توجه به اهمیت توسعه روش‌های سریع تشخیصی، توسعه یک سیستم سریع، آنالیز اولیه و موثر هر هفت گروه مجزا از روتاویروس‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد که از نظر مطالعات اپیدمیولوژیک حائز اهمیت است (۱۵).

در مطالعه حاضر با بررسی‌های دقیق‌تر و بازنگری و بهینه‌سازی عوامل موثر در رنگ‌آمیزی ژن‌های روتاویروس (رنگ‌آمیزی نیترات نقره) که برای ارزیابی خالص‌سازی ژنوم dsRNA روتاویروس در الکتروفورز ژل‌پلی‌آکریل‌آمید استفاده می‌شود؛ تلاش گردید تا روش رنگ‌آمیزی موجود (۱۶و۱۷) تسهیل گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که با روش الکتروفورز ژل‌پلی‌آکریل‌آمید و رنگ‌آمیزی نیترات نقره معرفی شده در این مطالعه نسبت به روش معمول در زمان کمتر، هزینه پایین تر و با حساسیت بیشتر می‌توان ژنوم روتاویروس را تشخیص داد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه آقای علی تیموری برای اخذ درجه دکتری در رشته ویروس‌شناسی پزشکی از دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس بود و با حمایت مالی آن دانشگاه انجام گردید.

References

1. Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. 5th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2007; pp: 1918-58.

2. Karim MR, Rume FI, Alam MM, Ahmed MU. Molecular epidemiologic study on avian rotavirus prevailing in Bangladesh. Bangl J Vet Med. 2007;5(1-2): 43-48.

3. Kelkar SD, Bhide VS, Ranshing SS, Bedekar SS. Rapid ELISA for the diagnosis of rotavirus. Indian J Med Res. 2004 Feb; 119(2):60-5.

4. Masurkar DM, Khatib SI, Williamson MT, Naik NV, Narvekar DT, Jadhav AA, et al. Latex Agglutination Test: A tool for rapid diagnosis of Rotavirus from HIV sero-positive and sero-negative patients with diarrhea. Biology and Medicine. 2013 Jan-Mar; 5(1): 34.

5. Hwang SY, Jin LT, Yoo GS, Choi JK. Silver staining method for DNA in polyacrylamide gels using eriochrome black T as a silver-ion sensitizer. Electrophoresis. 2006 May;27(9):1744-8.

6. Dolan KT, Twist EM, Horton-Slight P, Forrer C, Bell LM Jr, Plotkin SA, et al. Epidemiology of rotavirus electropherotypes determined by a simplified diagnostic technique with RNA analysis. J Clin Microbiol. 1985 May;21(5):753-8.

7. Westermeier R. Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations. New York: Wiley. 2005.

8. Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem. 1991 Jul;196(1):80-3.

9. Qu L, Li X, Wu G, Yang N. Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. Electrophoresis. 2005 Jan; 26(1):99-101.

10. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Nat Protoc. 2006; 1(4): 1852-8.

11. Teimoori A, Soleimanjahi H, Pourasgari F. [Comparison of Rotavirus RF Strain and HSV-1 Titration by CCID50% and Plaque Assays]. Modares J Med Sci Pathol. 2012; 15(2):35-45. [Article in Persian].

12. Babiuk LA, Mohammed K, Spence L, Fauvel M, Petro R. Rotavirus isolation and cultivation in the presence of trypsin. J Clin Microbiol. 1977 Dec; 6(6): 610-17.

13. An ZW, Xie LL, Cheng H, Zhou Y, Zhang Q, He XG, et al. A silver staining procedure for nucleic acids in polyacrylamide gels without fixation and pretreatment. Anal Biochem. 2009 Aug; 391(1):77-9.

14. Byun SO, Fang Q, Zhou H, Hickford JG. An effective method for silver-staining DNA in large numbers of polyacrylamide gels. Anal Biochem. 2009 Feb;385(1):174-5.

15. Ahmadi E, Soleimanjahi H, Sadegizadeh M, Teimoori A. [Rearranged Bovine Rotavirus Production through Cultivation of Virus by High Multiplicity of Infection (MOI) in Cell Culture and Amplification of Non-structural Genes using RT-PCR]. Modares J Med Sci Pathol. 2012; 15(3): 1-9. [Article in Persian]

16. WHO. Manual of rotavirus detection and characterization methods. Geneva:World Health Organization. 2009.

17. Khansarinejad B, Soleimanjahi H, Mirab Samiee S, Hamidieh AA, Paryan M, Sanahmadi Y. Quantitation of human cytomegalovirus DNA in plasma using an affordable in-house qPCR assay. J Virol Methods. 2012 Aug;183(2):170-5.

Short Communication

Detection of rotavirus genome by new silver staining method

Ahmadi E (B.Sc)[1], Soleimanjahi H (Ph.D)*[2], Teimoori A (Ph.D)[3]

[1]M.Sc Student in Medical Virology, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. [2]Associate Professor, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Virology, Ahvaz Jundishapur University of Medical Science, Ahvaz, Iran.

Abstract

Background and Objective: Rotaviruses are the members of the Reoviridae family containing double-stranded RNA (dsRNA) genome which are the main cause of gastroinentritis particularly in children less than three years. This study was designed to evaluate the detection of rotavirus genome by new silver staining method using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

Method: In this descriptive study, the samples were collected from infected MA-104 cell culture and the RNA electrophoresis was performed in 10% polyacrylamide slab gels after RNA extraction.

Results: According to polyacrylamide gel electrophoresis and sensitive staining analysis, rotavirus RNA segments were divided into 4 groups and single-nucleotides differences were clearly detected rapidly.

Conclusion: New silver staining method using polyacrylamide gel electrophoresis has the capacity to detect the rotavirus electeropherotype within a few minutes even in small DNA/RNA pieces up to 7 picograms.

Keywords: Rotavirus, Polyacrylamide gel electrophoresis, Silver staining

*** Corresponding Author: Soleimanjahi H (Ph.D), E-mail: soleim_h@modares.ac.ir**

Received 27 Feb 2013 **Revised** 3 Mar 2014 **Accepted** 17 Aug 2014

This paper should be cited as: Ahmadi E, Soleimanjahi H, Teimoori A. [Detection of rotavirus genome by new silver staining method]. J Gorgan Uni Med Sci. 2015; 16(4): 126-130. [Article in Persian]