استفاده از روش 16S Single Specific Primer PCR (16S SSP- PCR) به منظور شناسایی و جداسازی اختصاصی جنس شیگلا

حمیدرضا ملاصالحی[1*]، نرگس واحدی پور[1] و ماهرخ علیمی[2]

[1] **ایران، تهران، دانشگاه شهیدبهشتی، دانشکده علوم و فنآوری زیستی، گروه میکروبیولوژی و زیست فناوری میکروبی**

[2] **ایران، سمنان، دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکده علوم پایه، گروه بیوشیمی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۲۶

چکیده

در این مطالعه از روش Single Specific Primer PCR (SSP-PCR) به منظور جداسازی ژن 16S rRNA و شناسایی جنس شیگلا استفاده شد. این روش با طراحی تنها یک پرایمر اختصاصی و تکثیر ژن انجام می شود. در این مطالعه، ژن 16S rRNA گونه های مختلف باکتری شیگلا با ژن مذکور در ۵۷ باکتری مرتبط دیگر، مورد همردیفی قرار گرفت و تک پرایمر اختصاصی در ناحیه متغییر V6 طراحی شد. محصول تکثیر به روش الکتروفورز دوبعدی بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت و تشکیل باند 263 جفت بازی به عنوان پاسخ مثبت در نمونه ها در نظر گرفته شد. مشخص گردید که در هر چهار گونه جنس شیگلا (شیگلا فلکسنری، شیگلا دیسانتری، شیگلابوییدی و شیگلا سونئی)، شناسایی به طور اختصاصی صورت گرفته و سایر گونه ها باند مرتبط را ایجاد نکردند. استفاده ژن 16S rRNA در کنار روش SSP-PCR، یک ترکیب بسیار کاربردی در شناسایی اختصاصی باکتریها در کوتاه ترین زمان با سهولت بالا می باشد. از کاربردهای این روش شناسایی می توان به تشخیص زودهنگام عفونتهای باکتریایی به ویژه در شرایط اضطرار اشاره کرد.

واژه های کلیدی: 16S rRNA، single specific primer PCR، شناسایی باکتری ، باکتری جنس شیگلا

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۹۹۰۵۹۴۲، پست الکترونیکی: H_mollasalehi@sbu.ac.ir

مقدمه

RNA های ریبوزومی یکی از بیومارکرهای مهم سلول برای شناسایی و طبقه بندی باکتریها به شمار می روند (۲۲). RNA های ریبوزومی نسبت به دیگر ریبونوکلئیک اسید ها ، دارای تعداد نسخه های ژنی بیشتری هستند (حدود ۱۰۰۰۰ کپی در یک سلول) (۱۳). این تعداد زیاد باعث افزایش حساسیت تشخیص اولیه می‌شود (۹ و ۱۱). rRNA ها به دلیل همراهی با پروتئینهای ریبوزومی از پایداری بالایی برخوردار بوده (۸) ، بنابراین، کاربری و دستورزی آن در آزمایشگاه آسان تر می باشد. از بین انواع rRNA های موجود در سلول باکتریایی، 16S rRNA جهت تشخیص و شناسایی اختصاصی، بر اساس روش تکثیر ماده ژنتیکی ارجحیت داده می شود زیرا این ریبونوکلئیک اسید توسط چندین ایران در ژنوم باکتری کد شده (۱۷) و تعداد توالیهای موجود در بانک اطلاعات ژنی که جهت مقایسه باکتری مورد نیاز است، بسیار بیشتر از rRNA های دیگر است (۷). علاوه بر این، 16S rRNA که حدوداً ۱۵۵۰ جفت بازی بوده که دارای دو بخش مجزا در توالی خود است: ۱- بخش حفاظت شده که عموماً مشترک بین باکتریهای مختلف یک جنس می باشد. ۲- بخشهای متغیر که دارای چند ریختی کافی جهت تشخیص باکتریهاست. بنابراین، با در نظر گرفتن اینکه قسمتهایی از ژن 16S rRNA در بین باکتریهای مختلف حفاظت شده

است ، می توان با تطبیق مناطق حفاظت شده و مقایسه مابقی نواحی که در بسیاری از گونه های باکتریایی متفاوت است، باکتریها را شناسایی و جداسازی نمود(۶، ۱۲ و ۲۳).

PCR با استفاده از تک پرایمر اختصاصی (Single Specific Primer PCR) روشی است که در آن یک پرایمر اختصاصی و یک پرایمر غیراختصاصی جهت تکثیر توالی هدف استفاده می گردد (۱۶). این روش در موقعیتهایی که محدودیت تعداد توالی در انتخاب منطقه ژنی وجود دارد، بسیار موثر می باشد. به عنوان مثال، زمانی که اطلاعات بسیار کمی از یک ژن ناشناخته در دسترس باشد و تعداد توالی کوتاهی (در حدود طول یک پرایمر) از آن ژن شناسایی شده و در دسترس باشد و یا هنگامی که طول ناحیه اختصاصی مورد نظر به اندازه ای کوتاه باشد که استفاده از دو پرایمر اختصاصی امکان پذیر نباشد، این روش یکی از بهترین گزینه ها می باشد که به صورت حرکت یک طرفه به سوی منطقه ناشناخته یا منطقه غیراختصاصی انجام می شود (۱۰ و ۱۶). با توجه به اینکه بیش از ۹۵ درصد ساختار ژن 16S rRNA در بین باکتریها محافظت شده و دارای یکنواختی بالا در گونه های مختلف می باشد، محدودیتهایی در انتخاب منطقه ژنی مناسب وجود خواهد داشت. بنابراین به دلیل کوتاه بودن ناحیه غیریکنواخت اختصاصی در ژن 16S rRNA و عدم امکان استفاده از دو پرایمر اختصاصی در ناحیه هتروژن، این روش تکثیر در اولویت قرار می گیرد. در این حالت، ابتدا تک پرایمر اختصاصی در ناحیه متغیر طراحی می شود. سپس، از طریق تکثیر ژن توسط روش PCR و بررسی نتایج حاصل از ژن تکثیر یافته با روشهای اختصاصی یا غیراختصاصی، سلول مورد نظر مورد شناسایی دقیق قرار می گیرد.

جنس شیگلا دارای چهار گونه مختلف می باشد که عبارتند از شیگلا دیسانتری ، شیگلا فلکسنری ، شیگلا بوئیدی و شیگلا سونئی . تمامی گونه های شیگلا می توانند عامل اسهال خونی باسیلی یا شیگلوز باشند اما شدت بیماری، مرگ و میر و اپیدمیولوژی هرگونه متفاوت می باشد . با توجه به شیوع فراوانی شیگلوز و گاستروانتریت ناشی از جنس شیگلا در کشور های در حال توسعه و همچنین کشورهای صنعتی، روند رو به افزایش جمعیت جهان و شیوع این بیماری در مناطق پرجمعیت و عفونت زایی بالا در این باکتری، تشخیص همزمان تمامی گونه های جنس شیگلا با یک روش حساس و اختصاصی درکوتاه ترین زمان حائز اهمیت است. روشهای شناسایی مولکولی مبتنی بر ماکرومولکولهایی مانند پروتئینها ، DNA و RNA دارای مزیت های مختلفی از جمله تشخیص سریع، حساسیت زیاد و اختصاصیت بالا نسبت به روشهای سنتی هستند (۱۰، ۱۴ و ۱۸).

هدف از انجام این مطالعه ، بررسی کارآمدی روش SSP-PCR جهت هدف قرار دادن ریبونوکلئیک اسیدهای ریبوزومی، به عنوان یک بیومارکر مناسب برای شناسایی و جداسازی سلولهای باکتریایی مخصوصاً جنس شیگلا و همچنین بررسی میزان اختصاصیت، سهولت کاربری و حساسیت استفاده از 16S SSP- PCR به منظور شناسایی انواع باکتریهای مولد شیگلوز می باشد.

مواد و روشها

مواد مورد استفاده: تمام مواد شیمیایی از شرکت مرک (Merck) آلمان خریداری شدند به استثنای رنگ بارگیری DNA و آنزیم DNAتک پلیمراز که از شرکت سیناکلون ایران و نشانگر اندازه DNA که از شرکت ترموساینتیفیک فیشر امریکا و سرم جنین گاوی که از شرکت بیوکرم انگلستان خریداری شدند. تمام باکتریهای مورد استفاده در این مطالعه از محل سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران و انستیتیو پاستور به صورت آمپولهای لیوفیلیزه خریداری شدند. پرایمرهای طراحی شده از شرکت بیونیر کره جنوبی با غلظت ۱۰۰ پیکومول خریداری شدند.

تهیه و کشت باکتریها: برای تهیه محیط کشت مایع، از پودر تریپتیکاز سوی براث (TBS) به همراه سرم جنین گاوی (۱/۵ درصد) استفاده شد و به منظور تهیه محیط کشت جامد برای باکتریها از محیط تریپتیکاز سوی آگار (TSA) استفاده شد. سپس باکتریها از حالت لیوفیلیزه خارج شده و آنها در محیط مایع کشت داده شدند تا وارد فاز لگاریتمی شوند. پس از اطمینان از زنده شدن تمام باکتریها، به منظور تهیه موجودی انبار برای نگهداری طولانی مدت باکتریها، از هر باکتری ۸۵۰ میکرولیتر و ۱۵۰ میکرولیتر از گلیسرول ۱۰۰ درصد داخل یک لوله ریخته و در دمای 80- درجه سانتی گراد قرار داده شد.

استخراج کامل نوکلئیک اسید باکتری: استخراج نوکلئیک اسید با استفاده از روش ذرات سیلیکا صورت گرفت (۳ و ۵). در ابتدا به منظور جداسازی سلولهای باکتریایی، ۱ میلی لیتر از محیط کشت مایع ۲۴ ساعت گرماگذاری شده از هر باکتری در داخل لوله ها ریخته و با دور 12000g به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد و سلولها ته نشین شدند. سپس محلول رویی دور ریخته شد. بافرلیزکننده شامل ۶ گرم از گوانیدیوم تیوسیانات در ۵ سی سی از محلول ۰,۱ مولار تریس هیدروکلراید با pH=6.4 و ۱/۱ سی سی از محلول ۰/۲ مولار اتیلن دی آمین ترا استیک اسید با pH=8 بود. محلول ذرات سیلیکا فعال شده به این صورت تهیه گردید که ۳ گرم سیلیکون دی اکساید را به حجم ۲۵ رسانده و ۲۱ سی سی را پس از ۲۴ ساعت از محلول روی آن کشیده و توسط هیدروکلریک اسید به pH=2 رسانده شد. محلول لیزکننده واکنش همزمان با عمل استخراج به صورت ترکیب ۹۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده به همراه ۴۰ میکرولیتر از محلول ذرات سیلیکا تهیه شد و به لوله حاوی باکتری اضافه گردید. لوله باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس به مدت ۵ ثانیه ورتکس و بعد از آن به مدت ۱۵ ثانیه با دور 12000g سانتریفیوژ شد. سپس لوله حاوی باکتری به صورت متناوب ۲ مرتبه با محلول شستشو، ۲ مرتبه با الکل ۷۰ درصد و ۱ مرتبه با استون شستشو داده شد. محلول شستشو حاوی ۶ گرم گوانیدیوم تیوسیانات در ۵ سی سی از محلول تریس هیدروکلراید با pH=6.4 بود. به منظور خارج شدن کامل استون، ۱۰ دقیقه با درب باز درون آون ۵۶ درجه سانتی گراد قرار داده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از TE بافر به لوله اضافه شد و به آرامی ورتکس کرده و سپس به مدت ۲ دقیقه با دور 12000g سانتریفیوژ شد. TE بافر حاوی ۱۰۰ سی سی محلول تریس هیدروکراید ۱۰ میلی مولار و ۱۰۰ سی سی دی آمین ترا استیک اسید ۱ مولار بود. محلول رویی به لوله دیگری منتقل شده و برای ادامه مراحل مورد استفاده قرار گرفت. جهت بررسی کمی نوکلئیک اسید های استخراج شده، جذب آنها در طول موج 260 nm مورد اندازه گیری قرار گرفت. هر OD مساوی یک، معادل ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر نوکلئیک اسید می باشد که برای ادامه مراحل، مناسب ارزیابی گردید .علاوه براین، بررسی کیفی نوکلئیک اسید های استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز صورت گرفت. نمونه ژنومیک استخراج شده ابتدا بر روی ژل ۲ درصد ران شد.

نحوه انتخاب ژن و منطقه ژنی مناسب: ژن 16S rRNA در ۶۱ باکتری، اعم از باکتریهای جنس شیگلا و باکتریهای گرم منفی مرتبط دیگر مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. مشخصات پرایمر های سنتز شده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- خصوصیات پرایمر های طراحی شده

نوع پرایمر	توالی	Tm(سانتی گراد)	%GC	اختصاصیت
پرایمر۱(19 bp)	5' CTCTTGCCATCGGATGTGC 3'	۵۶°C	۸۹.۵۷٪	اختصاصی
پرایمر۲(24 bp)	5' TGAGCAAAGGTATTAACTTTACTC 3'	۴۸,۹ °C	۳.۳۳٪	عمومی

تکثیر ژن 16S rRNA به روش SSP-PCR : در این روش، با اینکه هر دو رشته DNA هدف توسط پرایمرها شناسایی می شوند ولی تنها یک پرایمر به صورت اختصاصی عمل می کند (۴). پرایمر ۱ و ۲ طراحی شده با غلظت ۱۰۰ پیکومول تهیه شد. سپس پرایمر ۱ با افزودن ۱۱۹ میکرولیتر آب مقطر و پرایمر ۲ با افزودن ۸۴۰ میکرولیتر آب مقطر به غلظت نهایی رسیدند. با توجه به غلظت مورد نیاز برای روش تکثیر، هر یک از پرایمر ها به نسبت یک دهم رقیق شد و مورد استفاده قرار گرفت. در هر مخلوط واکنش، ۲ میکرولیتر بافر PCR 1X، ۰,۴ میکرولیتر از داکسی نوکلئوتید تری فسفات ۰/۲ مولار، ۰/۴ مایکرولیتر $MgCl_2$ ۱ مولار (این در حالی است که این تست یک بار با $MgCl_2$ ۱,۵ مولار انجام شد و نتیجه حاصل نشد)، ۰/۸ مایکرولیتر از پرایمر ۱ با غلظت ۰/۴ پیکومول، ۰/۸ میکرولیتر از پرایمر ۲ با غلظت ۰/۴ پیکومول ، ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم تک DNA پلیمراز، ۱۴/۳ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده و ۱ میکرولیتر از DNA باکتری مورد نظر ریخته شد و لوله ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت و به این ترتیب تکثیر صورت گرفت: سیکل اول شامل یک تکرار ۹۴ درجه ۱۰ دقیقه و سیکل دوم شامل ۳۰ تکرار؛ به منظور واسرشت شدن دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، برای اتصال دمای ۴۸ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و برای تکثیر دمای ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه اعمال شد. باتوجه به اینکه آنزیم DNA پلیمراز مذکور در هر دقیقه 1000 bp باز را می سازد و ژن 16S rRNA دارای 1500 bp می باشد، زمان تکثیر ۹۰ ثانیه قرار داده شد. در نهایت محصول تکثیر یافته تا زمان بررسی توسط الکتروفورز دردمای ۴ درجه نگهداری شد.

بررسی محصول تکثیر ژن به روش الکتروفورز افقی: برای بررسی امپلیکون با استفاده از روش الکتروفورز، بر روی ژل آگارز ۲ درصد، ۱۰ میکرولیتر از نمونه به همراه ۲ میکرولیتر از رنگ بارگیری DNA و نیز ۱ میکرولیتر از DNA Safe Strain مورد استفاده قرار گرفت. به همراه نمونه ها یک میکرولیتر از 100 bp نشانگر اندازه DNA در چاهکی مجزا لود شد. ولتاژ بر روی ۷۰ تا ۸۰ میلی ولت تنظیم گردید تا محلول ران شده از چاهکها خارج گردند. پس از حدود ۴۵ دقیقه ژل از تانک خارج شد و و در داخل دستگاه Gel Doc قرار داده شد. ژلهای ران شده در دستگاه UV trans-illuminator مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از قرار دادن ژل در داخل دستگاه شکل ژل گرفته شد. یک لوله کنترل منفی نیز در نظر گرفته شد که حاوی فقط ۱ میکرولیتر از رنگ بارگیری DNA بود.

بررسی اختصاصیت روش 16S SSP- PCR: به منظور بررسی اختصاصیت این روش برای تشخیص باکتری جنس شیگلا علاوه بر این جنس، هشت باکتری از خانواده انتروباکتریاسه (جدول ۲) انتخاب شد تا پس از تکثیر ژن 16S rRNA آنها توسط روش SSP-PCR، میزان اختصاصیت روش و توانایی افتراق آن مشخص گردد.

نتایج و بحث

در این مطالعه از یک منطقه ژنی اختصاصی در بخش متغییر ژن عمومی باکتریایی و محافظت شده در طول تکامل به نام 16S rRNA به عنوان یک بیومارکر برای شناسایی باکتری جنس شیگلا با بهره گیری از روش SSP-PCR استفاده شد و میزان حساسیت و اختصاصیت این روش مورد بررسی قرار گرفت. شناسایی گونه های باکتریایی، به خصوص گونه های بیماریزا، در شرایط اضطراری به کمک یک روش سریع، حساس و آسان همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است. در این مطالعه، به دلیل شیوع گاستروانتریت ناشی از انواع باکتریهای جنس شیگلا، شناسایی این جنس به کمک یک روش مولکولی و اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. با کمک روش 16S SSP-PCR، می توان یک روش آسان و اختصاصی برای شناسایی باکتری جنس شیگلا ارائه داد.

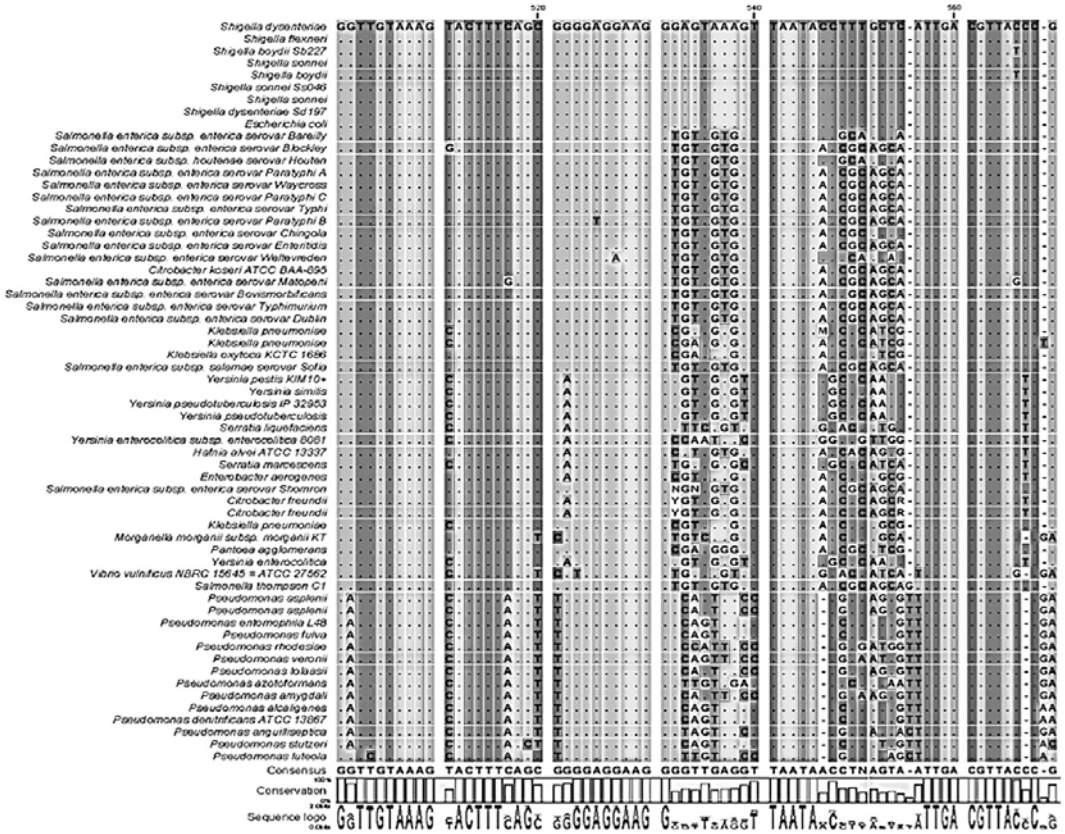
جدول ۲- خصوصیات باکتریهای مورد بررسی

نام باکتری	کد	مرکز سفارش
Shigella dysenterie	PTCC1188	سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
Shigella flexneri	PTCC1234	سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
Pseudomonas aeruginosa	PTCC1707	سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
Serratia marcescens	PTCC1621	سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
Citrobacter freundii	PTCC1600	سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
Yersinia entrocolitica	PTCC1151	سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
Salmonella typhi	PTCC1609	سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
Entrobacter aerogenes	PTCC1221	سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
Klebsiella pneumonia	PTCC1402	سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
Morganella morganii	PTCC1078	سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
Proteus mirabilis	PTCC1776	سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
Shigella sonnei	ATCC9290	انستیتو پاستور
Shigella boydii	ATCC9207	انستیتو پاستور

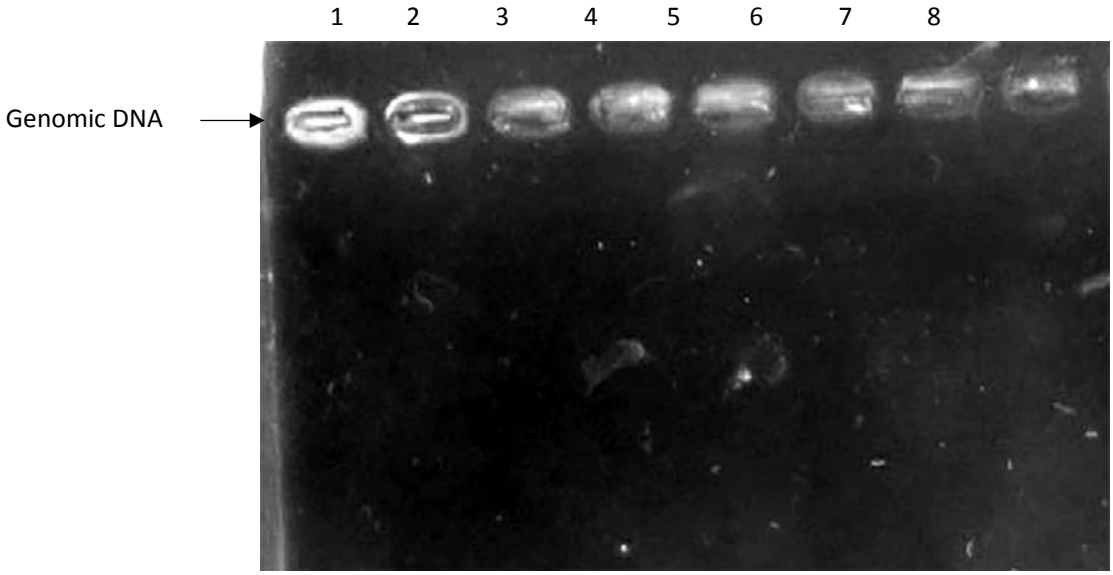
انتخاب منطقه ژنی مناسب و طراحی پرایمر: باتوجه به اینکه ژن 16S rRNA دارای مناطق حفاظت شده و متغیر مختلف می باشد، توالی ژن 16S rRNA چهار گونه از باکتری جنس شیگلا (شیگلا دیسانتری، شیگلای بوئیدی، شیگلا سونئی و شیگلا فلکسنری) و ۵۷ باکتری گرم منفی دیگر، جهت انتخاب بهترین منطقه ژنی مورد همردیفی قرار گرفت. لازم به ذکر است بهترین منطقه ژنی، منطقه ای از ژن است که دارای بیشترین میزان یکنواختی را در بین گونه های شیگلا و بیشترین غیریکنواختی را با بقیه سویه های مرتبط با این جنس داشته باشد. پس از بررسی ژنوم باکتریها، منطقه ۵۳۲-۵۵۵ با بیشترین میزان غیریکنواختی در بین باکتریهای غیر شیگلا، به عنوان بهترین منطقه ژنی به منظور شناسایی و جداسازی جنس شیگلا انتخاب شد. یک پرایمر اختصاصی برای ژن 16S rRNA در ناحیه ۵۳۲-۵۵۵ و یک پرایمر غیراختصاصی در ناحیه ۲۲۷-۲۴۵ طراحی شد و برای PCR مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). در روند تکثیر توسط روش SSP-PCR، پرایمر ها به محل هدف اتصال یافته و تکثیر صورت گرفت.

دستیابی به نوکلئیک اسید کامل سلولها: استخراج نوکلئیک اسید با انتخاب روش ذرات سیلیکا و گوانیدیوم تیوسیانات صورت گرفت. به دلیل سنگین بودن ژنوم (حدود ۵ میلیون باز) و کوچک بودن منافد ژل، نتیجه مطلوب حاصل نشد. با تغییر غلظت ژل و استفاده از غلظت ۱ درصد، باند ها در نزدیکی چاهکهای ژل ایجاد شدند (شکل ۲) که نشانه صحت انتخاب روش استخراج مناسب و فرایند استخراج نوکلئیک اسیدها بود.

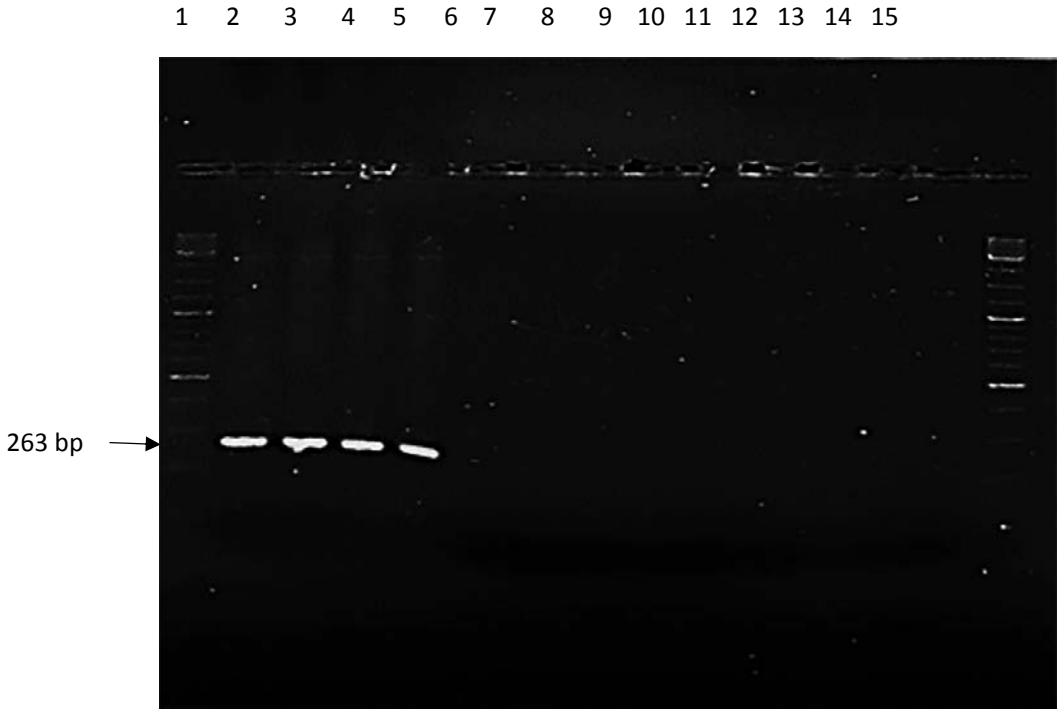
بررسی محصولات حاصل از SSP-PCR: در بررسی محصول تکثیر یافته حاصل از PCR باکتریها به روش الکتروفورز بر روی ژل اگارز، مشاهده باند bp ۲۶۳ به عنوان پاسخ مثبت در نمونه های تحت بررسی در نظر گرفته شد. ژنوم ۱۲ نمونه باکتری که عبارتند از شیگلا دیسانتری، شگلا بوئیدی، شیگلا فلکسنری، شیگلا سونئی، سراشیا مارسسانس، سودوموناس ایروجنزا، سالمونلا تیفی، سیتروباکتر فروندی، کلبسیلا پنومونیه، یرسینیا انترکولیتیکا، انتروباکتر ایروژنزا و مورگانلا مورگانی مورد بررسی قرار گرفت و در بررسی نهایی، تنها در ۴ گونه از جنس شیگلا به نامهای شیگلا دیسانتری، شیگلا فلکسنری، شیگلا سونئی و شیگلا بوئیدی باند مربوطه در محل مورد نظر حاصل شد و از سایر باکتریها هیچ گونه باندی در محل مورد نظر مشاهده نشد (شکل ۳).



شکل ۱- همردیفی منطقه ژنی در باکتری جنس شیگلا و سایر باکتریهای مورد بررسی. مناطق نوکلئوتیدی مشابه با نقطه مشخص شده است و مناطق نوکلئوتیدی متفاوت با حروف نمایش داده شده است. منطقه ۵۳۲-۵۵۵ ژن ۱۶S rRNAباکتریهای مورد همردیفی قرار گرفته نمایش داده شده است.



شکل ۲- استخراج DNA ژنومی. چاهک شماره ۱ سودوموناس ایروژنزا، چاهک شماره ۲ سیتروباکتر فروندی،چاهک شماره ۳ سراشیا مارسسانس، چاهک شماره ۴ شیگلا دیسانتری، چاهک شماره ۵ شیگلا فلکسنری، چاهک شماره ۶ شیگلا سونئی، چاهک شماره ۷ شیگلا بویدی،چاهگ شماره ۸ مورگانلا مورگانی



شکل ۳- بررسی اختصاصیت روش SSP-PCR و محصول تکثیر یافته اختصاصی و غیر اختصاصی. چاهک شماره ۱ لدر چاهک شماره ۲ شیگلا دیسانتری، چاهک شماره ۳ شیگلا فلکسنری، چاهک شماره ۴ شیگلا سونئی، چاهک شماره ۵ شیگلا بویدی، چاهک شماره ۶ سراشیا مارسسانس، چاهک شماره ۷ سودوموناس ایروجنزا، چاهک شماره ۸ سالمونلا تیفی، چاهک شماره ۹ سیتروباکتر فروندی، چاهک شماره ۱۰ کلبسیلا پنومونیه، چاهک شماره ۱۱ یرسینیا انترکولیتیکا، چاهک شماره ۱۲ انتروباکتر ایروژنزا، چاهک شماره ۱۳ مورگانلا مورگانی، چاهک شماره ۱۴ کنترل منفی(رنگ+آب)، چاهک شماره ۱۵ لدر. باند bp ۲۶۳ در شکل مشخص شده است.

در بررسی کمی نتایج، ۱۰۰ درصد گونه های جنس شیگلا به کار رفته در این مطالعه با روش 16S SSP-PCR مورد شناسایی قرار گرفت و ۱۰۰ درصد سویه های دیگر (غیر از جنس شیگلا) باند مربوط را تشکیل ندادند. بنابراین شناسایی جنس شیگلا به صورت اختصاصی صورت گرفت.

شناسایی باکتریها به صورت رایج توسط روشهای بیوشیمیایی انجام می شود (۲) ولی تحقیقات متعددی برای شناسایی جنس شیگلا توسط روشهای مولکولی وجود دارد. در سال ۱۹۹۸ در تحقیق صورت گرفته در کشور اسپانیا، ژن اختصاصی مقاومت *virA* به همراه ژن غیراختصاصی 16S rRNA با طراحی پرایمر اختصاصی و روش PCR برای شناسایی جنس شیگلا مورد استفاده قرار گرفت و باکتریهای جنس شیگلا و ای کلای به صورت همزمان مورد شناسایی قرار گرفتند (۲۱). در مطالعه حاضر، با استفاده از یک ژن غیراختصاصی و زمان بسیار کمتر، باکتری جنس شیگلا به صورت ۱۰۰ درصد مورد شناسایی قرار گرفت. در سال ۲۰۰۵ در کشور مالزی، در مطالعه صورت گرفته بر روی باکتریهای ایجاد کننده گاستروانتریت، ژن مقاومت *setlA*، *setlB* و *ipaH* and *ial* توسط طراحی پرایمرهای اختصاصی و به کمک روش مالتیپلیکس PCR برای شناسایی جنس شیگلا، صورت گرفت و در نهایت گونه های جنس شیگلا مورد شناسایی قرار گرفتند. در این تحقیق نیز از ۲ ژن اختصاصی به منظور تشخیص این جنس استفاده شد (۲۰) در صورتی که در روش 16S SSP-PCR، توسط تنها یک ژن گونه های جنس شیگلا مورد شناسایی قرار می گیرند.

همان طور که قبلا ذکر شد، ژن 16S rRNA یک ژن محافظت شده در طول تکامل می باشد (۱). برای نواحی محافظت شده این ژن، پرایمر های جهانی طراحی شده است. در بررسی صورت گرفته در چین توسط پنگ و همکارانش در سال ۲۰۰۲، ژن 16S rRNA توسط پرایمر های عمومی و همچنبن با بهره گیری از روشهای ایمونولوژیکی، برای شناسایی جنس شیگلا، مورد استفاده قرار گرفت و شناسایی این باکتری انجام شد (۱۹). مزیت روش 16S SSP-PCR در مقایسه با تحقیق ذکر شده این می باشد که در آن تنها یک پرایمر اختصاصی و تنها یک ابزار تشخیصی (SSP-PCR) مورد استفاده قرار گرفته است. در سال ۱۳۸۴ در مطالعه ای که در کشور ایران صورت گرفته است، شناسایی ژنهای *stx*، *stx1* و *stx2* وهمچنین ژن آنزیم مالات دهیدروژناز، در باکتری شیگلا دیسانتری و باکتری ای کلای صورت گرفته است. در این بررسی نیز از روش PCR چندگانه برای شناسایی ژنهای نام برده شده استفاده شده است. نتایج به دست آمده نشان دهنده وجود *stx*، *stx1* و *stx2* و ژن مالات دهیدروژناز تنها در گونه خاصی از باکتری اشریشیا کلی و وجود ژن *stx* و *stx1* و ژن مالات دهیدروژناز در شیگلا دیسانتری می باشد. در این مطالعه تنها یک گونه از گونه های جنس شیگلا با استفاده از طراحی پرایمر برای ژن اختصاصی و یک ژن دیگر، مورد شناسایی قرار گرفت (۱۱). با کمک روش 16S SSP-PCR، تمام گونه های بیماریزای شیگلا به صورت اختصاصی تشخیص داده شدند. تحقیق دیگری در کشور ژاپن در سال ۲۰۰۲ توسط تاکهیرو ماکسوکی و همکارانش صورت گرفته است که در آن از ژن غیر اختصاصی 16S rRNA به همراه پرایمر های اختصاصی گروهی برای تشخیص باکتریهای موجود در نمونه بالینی انسان استفاده شد و پس از بررسیهای حاصل از PCR نمونه های مدفوعی، باکتریهای مورد انتظار شناسایی شدند (۱۵). در این مطالعه اختصاصیت برای گونه خاصی در نظر گرفته نشد و صرفاً جنس باکتری مورد نظر شناسایی گردید. در نهایت، در روش 16S SSP-PCR تشخیص در سطح جنس به صورت اختصاصی انجام شد. در سایر تحقیقات انجام شده به منظور شناسایی این جنس، در بیشتر موارد از ژن 16S rRNA به عنوان بیومارکر استفاده شده و غالبا تکثیر آن به وسیله پرایمر های عمومی صورت گرفته است و پرایمر اختصاصی برای تشخیص آن طراحی نشده است. در روش 16S SSP-PCR، با بیومارکر قرار دادن یک ژن عمومی و طراحی تنها یک پرایمر اختصاصی به کمک روش SSP-PCR، تمامی گونه های مورد آزمایش جنس شیگلا به صورت کامل مورد شناسایی اختصاصی قرار گرفت و باکتریهای جنس شیگلا از سایر باکتریها تمایز داده شد.

نتیجه گیری

روش 16S SSP-PCR، برای تشخیص اختصاصی جنس شیگلا مورد استفاده قرار گرفته و آن را به صورت کامل از دیگر گونه های باکتریهایی مورد استفاده در این تحقیق شناسایی کرد. سهولت این روش می تواند به علت طراحی فقط یک پرایمر اختصاصی در شرایطی که طراحی دو پرایمر مقدور نمی باشد، باشد. از کاربرد های این روش تشخیصی، می توان شناسایی عفونتهای باکتریایی، به ویژه در شرایط اضطراری همانند حوادث طبیعی، صنایع دفاعی و همچنین آزمایشگاههای تشخیص طبی به صورت کیتهای آزمایشگاهی را نام برد. همچنین از این روش می توان در جهت تشخیص اختصاصی دیگر گونه های بیماریزا و خطرناک باکتریایی که تشخیص اختصاصی آنها حائز اهمیت است، استفاده کرد.

منابع

۱- صادقی پور مروی م.، پوربابایی الف.، علیخانی ح.، حیدری الف.، منافی ز. ۱۳۹۶. ارزیابی عملکرد باکتریهای اکسید کننده گوگردی جدا سازی شده از خاک معدن مس و شناسایی مولکولی آنها بر اساس توالی 16S rRNA . مجله پژوهش‌های سلولی و

مولکولی، ۳۰(۱):۴۰-۵۴.

۲- نوری ص.، ناظری س.، حسینی پ. ۱۳۹۷. شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از سرکه سیب. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۳۱(۱): ۷۹-۹۲.

3- Bergallo M, Costa C, Gribaudo G, Tarallo S, Baro S, et al. ۲۰۰۶. Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. New Microbiologica 29(2):111-9

4- Blagodatskikh KA, Kramarov VM, Barsova EV, Garkovenko AV, Shcherbo DS, et al. ۲۰۱۷. Improved DOP-PCR (iDOP-PCR): A robust and simple WGA method for efficient amplification of low copy number genomic DNA. PloS one ۱۲(9):1-12

5- Boom R, Sol C, Salimans M, Jansen C, Wertheim-van Dillen P, Van der Noordaa J. ۱۹۹۰Rapid and simple method for purification of nucleic acids. Journal of clinical microbiology ۴۹۵:۵۰۳- ۲۸

6- Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. ۲۰۰۷. A detailed analysis of ۱۶S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. Journal of microbiological methods ۶۹(۲):330-9

7- El Bakkali M, Chaoui I, Zouhdi M, Melloul M, Arakrak A, et al. ۲۰۱۳. Comparison of the conventional technique and ۱۶s rDNA gene sequencing method in identification of clinical and hospital environmental isolates in Morocco. African Journal of Microbiology Research ۷(۵۰):۵۶۴۴-۵۶۳۷

8- Guetg C, Lienemann P, Sirri V, Grummt I, Hernandez□Verdun D, et al. ۲۰۱۰. The NoRC complex mediates the heterochromatin formation and stability of silent rRNA genes and centromeric repeats. The EMBO journal ۲۹(۱۳):۴۶-۲۱۳۵

9- Hang J, Desai V, Zavaljevski N, Yang Y, Lin X, et al. ۲۰۱۴. ۱۶S rRNA gene pyrosequencing of reference and clinical samples and investigation of the temperature stability of microbiome profiles. Microbiome ۲:۳۱

10- Jamshidi S, Javadi Taklimi SA, Potki P, Seighalani R. ۲۰۱۶. Identification of the first transgenic aquatic animal in Iran by PCR-based method and protein analysis. Journal of Genetic Resources 2(1):93-97

11- Keyhani A, Saadati M, Kamali M. ۲۰۰۶. Detection of shiga toxin genes by multiplex PCR. Journal of Military Medicine 7(4): 321-329

12- Kim O-S, Cho Y-J, Lee K, Yoon S-H, Kim M, et al. ۲۰۱۲. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic ۱۶S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. International journal of systematic and evolutionary microbiology 62(3):716-21

13- Kobayashi T. ۲۰۱۱. Regulation of ribosomal RNA gene copy number and its role in modulating genome integrity and evolutionary adaptability in yeast. Cellular and Molecular Life Sciences 68(8):1395-403

14- Mathew FP. ۲۰۰۶. Development of a versatile silicon-based biosensor platform for pathogen detection. Michigan State University

15- Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, et al. ۲۰۰۲. Development of ۱۶S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. Appl. Environ. Microbiol. 68(11):5445-51

16- Mollasalehi H, Yazdanparast R. ۲۰۱۳. Development and evaluation of a novel nucleic acid sequence-based amplification method using one specific primer and one degenerate primer for simultaneous detection of Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium. Analytica chimica acta 770:169-74

17- Nemergut DR, Knelman JE, Ferrenberg S, Bilinski T, Melbourne B, et al. ۲۰۱۶Decreases in average bacterial community rRNA operon copy number during succession. The ISME journal 10(5):1147-56

18- Patel P. ۲۰۱۲. Rapid analysis techniques in food microbiology. Springer Science & Business Media

19- Peng X, Luo W, Zhang J, Wang S, Lin S. ۲۰۰۲. Rapid detection of Shigella species in environmental sewage by an immunocapture

PCR with universal primers. Appl. Environ. Microbiol. 68(5): 2580–2583

20- Thong KL, Hoe SLL, Puthucheary S, Yasin RM. ۲۰۰۵. Detection of virulence genes in Malaysian Shigella species by multiplex PCR assay. BMC infectious diseases ۵:۸

21- Villalobo E, Torres A. ۱۹۹۸. PCR for detection of Shigella spp. in mayonnaise. Applied and Environmental Microbiology 64(4):1242-5

22- Wang Y, Qian P-Y. ۲۰۰۹. Conservative fragments in bacterial ۱۶S rRNA genes and primer design for ۱۶S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PloS one 4(10):e7401

23- Yang B, Wang Y, Qian P-Y. ۲۰۱۶. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in ۱۶S rRNA genes in phylogenetic analysis. BMC bioinformatics 17(1):135

Differentiation and specific detection of *Shigella* genus using 16S Single Specific Primer PCR (16S SSP- PCR)

Molasalehi H.R.[1*], Vahedipoor N.[1] and Alimi M.[2]

[1] Dept. of Microbiology & Microbial Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Biochemistry, Faculty of Basic Science, Damghan Branch, Azad Islamiz University, Damghan, I.R. of Iran.

Abstract

16S Single Specific Primer PCR (16S SSP- PCR) was used to facilitate the specific identification of 16S rRNA gene in this study. In this method, only one specific primer was designed for amplification of target genes. 16S rRNA gene of different species of *Shigella* genus was aligned with 57 other related bacteria and then a single specific primer was designed in the V6 variable region. The amplicon was analyzed on a two-dimension agarose gel electrophoresis. The 263 bp band was considered as positive result in the tested samples and was observed for all species of *Shigella* (*Sh. flexneri*, *Sh. boydii*, *Sh. dysenteriae*, *Sh. sonnei*), whereas other species remained unidentified. The specificity of the assay was evaluated to be complete. Combination of targeting 16S rRNA and using SSP-PCR method, is an efficacious method for specific detection of bacteria in a minimum required time with a great ease. Among the applications are namely the early-phase diagnosis of bacterial infections in acute emergency conditions such as natural disasters and countries' defense industry in the form of diagnostic kits for clinical laboratories.

Key words: 16S rRNA, single specific primer PCR, Bacterial diagnosis, *Shigella* genus