مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۱، شماره ۳ (شماره پیاپی ۴۴)، پاییز ۱۳۸۷، ۷-۱

بهینه سازی روش زنجیره‌ای پلی مرآز در تشخیص آلودگی آب به کلی فرم

دکترحمید ابطحی[1*]، محمدجواد قناد زاده[2]، علی هاتف سلمانیان[3]، احسان غزنوی راد[4]، مسعوده کریمی[5]، ندا مولایی[6]

۱- استادیار، دکترای تخصصی باکتری شناسی، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی ، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران

۲- مربی، بهداشت محیط، گروه بهداشت ، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران

۳- دانشیارپژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری، تهران، ایران

۴- مربی ، کارشناس ارشد باکتری شناسی، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی ، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران

۵- کارشناس آموزشی، میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی ، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران

۶- کارشناس زیست شناسی سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران

تاریخ دریافت۸۷/۲/۶ ، تاریخ پذیرش ۸۷/۶/۲۰

چکیده

مقدمه: در تشخیص عوامل میکروبی با استفاده از روش‌های ملکولی، تخلیص کروموزوم مرحله بسیار مهمی است. در این تحقیق با افزایش مدت زمان مرحله دناتوراسیون بدون تخلیص کروموزوم باکتری، با تخریب سلول، تکثیر DNA انجام می‌شود.

روش کار: در این مطالعه تجربی، رقت‌های۸/۱۰۰ ، ۴/۱۰۰ ، ۲/۱۰۰ ، ۱/۱۰۰ ، ۱/۲۰۰ ، ۱/۴۰۰ ، ۱/۸۰۰ و ۱/۱۶۰۰ از باکتری در آب مقطر تهیه گردید. پس از آن باکتری‌ها به روش فیلتراسیون از نمونه جدا گردید. بدون خالص سازی کروموزوم باکتری، با استفاده از روش زنجیره‌ای پلی مرآز و به کمک پرایمرهای طراحی شده، ژن 16sRNA تکثیر یافت. شناسایی آلودگی ۱۵ حلقه چاه آب شهر اراک و مقایسه آن با روش MPN جهت بررسی حساسیت روش فوق انجام گرفت.

نتایج: کشت رقت‌های تهیه شده نشان دهندهٔ تأیید تعداد باکتری‌ها در این رقت‌ها بود. نتیجه واکنش زنجیره‌ای پلی مرآز رقت‌ها (پس از فیلتراسیون) نشان داد که این سیستم قادر است وجود باکتری در این رقت‌ها را شناسایی کند. علاوه بر آن مقایسه تشخیص آلودگی آب به دو روش MPN و PCR انجام گرفته در این تحقیق، نشان دهنده حساسیت بالای روش اخیر بود.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده از این بررسی حاکی از آن است که با روش مذکور علاوه بر این که امکان بروز نتیجه منفی کاذب کمتر می‌شود نیاز به انجام مراحل سخت، پیچیده و وقت گیر تخلیص کروموزم نیز نمی باشد.

واژگان کلیدی: واکنش زنجیره ای پلی مرآز، آلودگی میکروبی آب، کلی فرم، تشخیص

* **نویسنده مسئول:** دکتر حمید ابطحی، استادیار گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

E-mail: h_abtahi2@yahoo.co.uk

مقدمه

پاتوژن‌های میکروبی از مهم‌ترین معضلات بهداشتی آب و فاضلاب می‌باشند. شناسایی این عوامل و حذف آنها، از مسایل مهم بهداشتی آب به شمار می‌آیند. در این روش‌های تشخیصی، از باکتری اشریشیا کلی به عنوان نشان‌گر برای بررسی آلودگی آب به مدفوع استفاده می‌گردد. روش‌های معمول برای شناسایی عوامل بیماری‌زا در آب علاوه بر این که وقت گیر و پرهزینه هستند، دقیق نیز نمی‌باشند. به همین علت برای شناسایی وجود عوامل بیماری‌زا در آب روش‌های جدیدی در دست مطالعه است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR[1]) از جمله روش‌هایی است که می‌تواند جایگزین مناسبی برای آزمایشات رایج باشد. روش اخیر حساس، دقیق، ارزان و سریع می باشد. کارآیی استفاده از PCR در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. با استفاده از روش فوق می‌توان تا حتی یک باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر آب را شناسایی نمود(۱).

برای انجام PCR از روش‌های مختلفی برای تخلیص اسید نوکلئیک باکتری‌ها استفاده شده است. رایج‌ترین روش‌های استفاده شده شامل: استفاده از گوانیدیوم تیوسیونات، لیز سلولی با استفاده از آنزیم، سونیکاسیون و استفاده از سرد و گرم کردن سلول باکتری[2](۲، ۳). در تمام روش‌های یاد شده مراحل مختلف شستشو و یا افزودن مواد مختلف شیمیایی باعث از دست رفتن اسید نوکلئیک و در نتیجه تاثیر بر روند واکنش زنجیره‌ای پلی مرازی می‌شود. لذا در این تحقیق سعی گردیده تا با افزودن زمان مرحله دناتوراسیون بدون استفاده از مواد شیمیایی و یا انجام مراحل مختلف شستشو، مستقیماً اسید نوکلئیک باکتری را وارد واکنش زنجیره پلی مرآزی نمود. تهیه رقت‌های مختلف از کلی فرم و انجام PCR با روش بالا نشان داد که حتی وجود یک باکتری را می‌توان در ۱۶۰۰ میلی لیتر آب تعیین نمود. در نهایت برای تعیین ارزش روش فوق در شناسایی حداقل تعداد باکتری در آب، از ۱۵ چاه تامین کننده آب شهر اراک نمونه‌برداری گردید و به روش فوق و MPN از نظر وجود باکتری، مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

این مطالعه یک مطالعه تجربی است. باکتری مورد استفاده در این تحقیق شامل اشریشیا کلی سویه DH5α (تهیه شده از مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی) می‌باشد. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک[3] و مواد استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلی مرآز از شرکت سیناژن تهیه گردید. در این تحقیق نظیر اغلب مطالعات انجام شده، از ژن 16s rRNA به عنوان ملکول هدف برای شناسایی باکتری استفاده شده است. علت انتخاب این ژن، بالا بودن تعداد کپی این ملکول و پایداری آن در سلول می‌باشد(۴). با استفاده از ترادف استاندارد ژن 16srRNA (شماره دسترسی :EF620925) از باکتری اشریشیا کلی، طراحی پرایمرهای رفت[4] و برگشت[5] انجام شد . ترادف پرایمر های مزبور به صورت زیر است:

Forward: 5" CGA GTG GCG GAC GGG TGA GT (FROM 81)
Reverse: 5" TCG ACA TCG TTT ACG GCG TGG A (FROM 786)

پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت فرآیند دانش آرین (نماینده شرکت MWG آلمان در ایران) ساخته شد. ابتدا رقت‌های متوالی از سلول باکتری اشریشیا کلی در ۱۰۰ میلی لیتر آب استریل تهیه گردید. برای تهیه رقتهای باکتری از محلول شماره یک مک فارلند استفاده گردید. برای تائید صحت رقت‌های باکتری تهیه شده از کشت، یک میلی لیتر هر رقت باکتری در محیط نوترینت آگار به صورت پور پلیت[6] استفاده شد. رقت‌های تهیه شده طبق جدول ۱ تهیه گردید:

1 - Polymerase Chain Reaction.
2 - Freeze and thaw.
3 - MEARK.
4 - Forward.
5 - Reverse.
6 - Pour Plate.

جدول ۱. رقت‌های تهیه شده از کلی فرم

رقت	۱/۱۶۰۰	۱/۸۰۰	۱/۴۰۰	۱/۲۰۰	۱/۱۰۰	۲/۱۰۰	۴/۱۰۰	۸/۱۰۰
تعداد باکتری	۱	۱	۱	۱	۱	۲	۴	۸
حجم آب (میلی لیتر)	۱۶۰۰	۸۰۰	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

پس ازعبور رقت‌های تهیه شده از فیلترهای نیترو سلولوز (شرکت میلی پور) با قطر ۰/۴۲ میکرون، در شرایط استریل فیلترها در داخل میکروتیوب ۰/۵ قرار گرفت. ۵۰ میکرولیتر از آب حاوی یک دهم درصد دی اتیل پیروکربنات[1] اتوکلاو شده به میکروتیوب افزوده گردید. سپس میکروتیوب‌ها با شدت ورتکس گردید تا سلول باکتری‌ها از سطح فیلتر به مایع داخل میکروتیوب رها شود.

غلظت عوامل PCR به این شرح استفاده گردید: یک میلی مولار از پرایمرهای بالا، ۲/۵ میلی مولار از یون منیزیوم، ۲۰۰ میلی مولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، ۲/۵ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر PCR با غلظت 1X حجم نهایی مخلوط PCR با آب مقطر استریل به ۱۰۰ میکرولیتر رسید. برای تخریب کامل سلول باکتری قبل از شروع برنامه، مخلوط PCR به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن این برنامه اجرا گردید:

مرحله اول PCR متشکل از سی و پنج چرخه که هر یک از سه قسمت تشکیل شده است. قسمت اول دناتورکردن (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه). در پایان مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و برای یک چرخه انجام می شود.

برای تائید صحت ترادف نوکلئوتید ژن بدست آمده از روش Nested PCR استفاده گردید. برای این منظور از ترادف زیر استفاده گردید:

Nested Primer: 5’ CGT TGG TAT CAA AGA GAC TCA GAA 3’ (From 418)

سپس از این برنامه استفاده گردید:

مرحله اول PCR متشکل از سی چرخه که هر یک از سه قسمت تشکیل شده است. قسمت اول دناتورکردن (۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو (۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت سوم تکثیر ژن هدف (۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه). در پایان مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و برای یک چرخه انجام می شود.

برای بررسی نهایی محصولات PCR، الکتروفورز آن بر روی ژل آگار ۱ درصد در بافر تریس بازی - اسید بوریک- EDTA (TBE با pH : ۸) انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام گرفت.

هم‌چنین جهت تایید حساسیت روش فوق از ۱۵ حلقه چاه تامین کننده آب شهر اراک نمونه‌گیری انجام شد. از هر چاه، ۲۵۰ میلی لیتر آب در ظروف استریل طبق استاندارد جمع‌آوری گردید. وجود کلی فرم در نمونه‌های تهیه شده با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مرآز و MPN (Most Probable number) بررسی گردید. این آزمایش به روش سه لوله‌ای انجام گرفت که بر اساس تولید یا عدم تولید گاز محتمل ترین تعداد کلی فرم تعیین می‌گردد.

داده‌های حاصل از سنجش نمونه‌ها، از نقطه نظر آلودگی میکروبی و آزمون ملکولی به روش آمار توصیفی جمع‌آوری و در قالب جدول مربوط منعکس گردید.

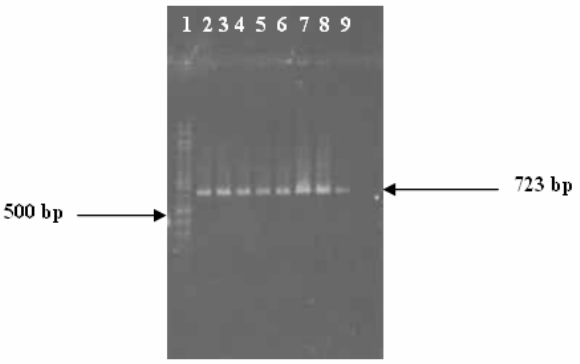
1 - DEPC water.

نتایج

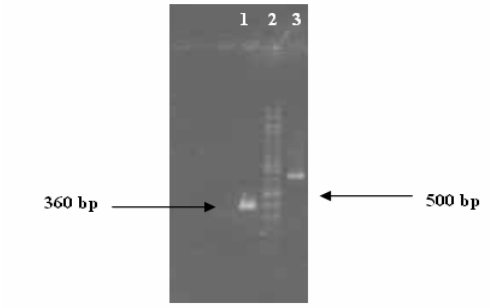
با تکثیر ژن مورد نظر با استفاده از پرایمرهای طراحی شده قطعه‌ای حدود bp ۷۲۳ به دست آمد. کشت رقت‌های تهیه شده در محیط کشت نوترین آگار به روش پور پلیت تعداد باکتری‌ها را در این رقت‌ها تائید نمود. نتیجه PCR رقت‌ها پس از فیلتراسیون نشان داد که این سیستم قادر است تا وجود ۱ باکتری در حجم ۱۶۰۰ میلی لیتر آب را شناسایی کند. نتیجه PCR در شکل ۱ آمده است.

نتیجه بررسی Nested PCR دال بر تایید ژن به دست آمده (16s rRNA) می‌باشد. همان‌گونه که در شکل ۲ آمده، قطعه ۳۶۰ باز براساس استفاده از پرایمر Nested Primer و پرایمر برگشت پس از PCR دیده شد.

برای بررسی کارآیی روش PCR، نمونه‌برداری از ۱۵ حلقه چاه انجام گردید. ۱۰۰ میلی لیتر از نمونه آب به روش PCR و ۱۰۰ میلی لیتر آب به روش MPN از نظر وجود اشریشیا کلی مورد آزمایش قرار گرفت. نتیجه این مرحله از آزمایش در جدول ۲ آمده است.



شکل ۱. نتیجه PCR رقتهای تهیه شده از اشریشیا کلی
ردیف ۱: مارکر BP ۱۰۰ – ردیف ۲ : رقت ۱/۱۶۰۰ – ردیف ۳ : ۱/۸۰۰ – ردیف ۴ : ۱/۴۰۰- ردیف ۵ : ۱/۲۰۰ – ردیف ۶ : رقت ۱/۱۰۰ – ردیف ۷ : رقت ۲/۱۰۰ –ردیف ۸ : رقت ۴/۱۰۰ – ردیف ۹ : رقت ۸/۱۰۰



شکل ۲ . نتیجه Nested PCR : ردیف ۱: محصول Nested PCR– ردیف ۲ : مارکر BP ۱۰۰ – ردیف ۳ : محصول PCR ژن 16s rRNA

جدول ۲. نتایج تست PCR و MPN آب ۱۵ چاه تامین کننده آب شهر اراک

شماره چاه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵
PCR	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MPN	–	–	+	–	+	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–

PCR : واکنش پلی مراز زنجیره ای

MPN: محتملترین تعداد کلی فرم

بحث

روش واکنش پلی مرآز زنجیره‌ای، تکنیکی حساس و دقیق بوده که با استفاده از آن نه تنها آلودگی مشخص می‌گردد بلکه نوع باکتری را نیز می‌توان تعیین نمود(۵). در این روش با تخلیص کروموزوم باکتری و تکثیر آن با پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه باکتری موجود در نمونه بررسی می‌گردد(۶). برای تخلیص کروموزوم باکتری از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. اما در اغلب موارد به

علت تعداد کم باکتری در آب و احتمال از دست دادن کروموزوم باکتری در مراحل مختلف تخلیص، باعث ثبت نتیجه منفی کاذب درPCR می‌گردد. برای افزایش کارآیی این روش‌ها جهت شناسایی حداقل باکتری، روش‌های مختلفی پیشنهاد شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱- تغلیظ نمونه مورد آزمایش با استفاده از فیلترهای میکروبیولوژی وآزاد سازی DNA باکتری با سرد و گرم نمودن آن

۲- شناسایی محصول PCR با استفاده از پروب‌های حامل مولد رادیواکتیو و یا غیر رادیو اکتیو(۷)

۳- کشت ۶ تا ۸ ساعته باکتری قبل از انجام مرحله PCR (۲، ۳، ۸).

حساسیت روش‌های فوق در حد تشخیص حداقل ۱ تا ۵ باکتری در۱۰۰ میلی لیتر آب است. این روش ها حتی در برخی موارد قادر به شناسایی تعداد ۱ باکتری در ۱۰۰ میلی لیتر آب را هم ندارند. شرط انجام یک آزمایش PCR موفق قرارگرفتن تمام عوامل آن در این واکنش می‌باشد. مهم‌ترین این عوامل قالب DNA می‌باشد. یکی از دلایل منفی کاذب شدن آزمایشات بالا در نتیجه از دست دادن DNA کروموزومی باکتری است. در این تحقیق بجای استفاده از روش‌های معمول تخلیص کروموزم باکتری و یا دیگر روش‌های ذکر شده، باکتری‌های به دست آمده پس از مرحله فیلتراسیون مستقیماً وارد واکنش پلی مرآز زنجیره‌ای گردید. بنابر این بدون از دست دادن کروموزوم باکتری مراحل بعدی واکنش زنجیره‌ای پلیمرآز ادامه می‌یابد. لذا برای این که باکتری در ابتدای واکنش PCR تخریب شده و کروموزوم آن آزاد گردد، زمان مرحله اول PCR (مرحله دناتوراسیون) تا ۱۰ دقیقه افزایش داده شد.

در این تحقیق حساسیت PCR تا وجود یک باکتری در حجم حدود ۲ لیتر آب افزایش پیدا کرد. حساسیت تشخیص آلودگی آب با استفاده روش فوق در مقایسه با روش‌های معمول نظیر MPN را به خصوص می‌توان ملاحظه نمود. چنانچه در جدول ۲ آمده است در بین ۱۵ چاه آب مورد مطالعه، روش MPN تنها توانسته است آلودگی ۵ چاه آب را نشان دهد. در عین حال در بررسی آلودگی آب چاه‌های فوق با روش PCR از ۱۵ چاه آب در۱۳ نمونه آلودگی نشان داده شد. بنابر این با این روش علاوه بر افزایش حساسیت PCR ، با توجه به حذف مراحل سخت و پیچیده تخلیص DNA می‌توان به سادگی از روش ملکولی در تعیین آلودگی آب به اشریشیا کلی استفاده نمود. نتایج این تحقیق را می‌توان برای شناسایی سایر عوامل آلودگی آب از جمله باکتری‌های کند رشد و ویروس‌ها نیز به کار برد.

این تحقیق در مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام گرفته است.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این بررسی حاکی از آن است که با روش مذکور علاوه بر این که امکان بروز نتیجه منفی کاذب کمتر می‌شود نیاز به انجام مراحل سخت، پیچیده و وقت گیر تخلیص کروموزم نیز نمی باشد.

منابع

1. Toze S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and waste water. Wat Res 1999; 33(17): 3545- 3556.

2. Bej AK, Meena H, Dicesare J, Atlas R. Polymerase Chain Reaction gene probe detection of microorganisms by using filter concentrated samples. Appl Environ Microb 1991; 57(12):3529-3534.

3. Iqbal D, Saundera D, Porter J. Efficiency of the polymerase chain reaction amplification of the gene for detection of Escherichia coli in contaminated water. Lett Appl Microb 1997; 24: 498- 502.

4. Rompre A, Srevais P, Baudart J, Rubin M, Laurent P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. J Microb Method 2002; 49: 31-54.

5. Horakova K, Mlejnkova H, Mlejnek P. Direct detection of bacterial fecal indicators in water samples using PCR.Water Sci Technol 2006; 54(3):135-40.
6. Sabat G, Rose P, Hickey JW, Harkin JM. Selective and sensitive for PCR amplification of Escherichia coli 16S rRNA Genes in soil. Appl Environ Microb 2000; 66(2): 844- 849.
7. Katsuji T, Ken K, Masao Y. Development of a Direct In Situ PCR Method for Detection of Specific Bacteria in Natural Environments.Appl Environ Microbial 1998; 64(4): 1536–1540.
8. Yanming L, Ainslie G, Jing Z, Xing F. Detection of Viable but Nonculturable Escherichia coli O157:H7 Bacteria in Drinking Water and River Water. Appl Environ Microbial 2008; 74(5): 1502–1507.

Journal of Arak University of Medical Sciences
Autumn 2008; 11(3): 1-7

Original Article

Improvement of PCR in detection of coliform in water pollution

Abtahi H[1*], Ghannadzadeh MJ[2], Salmanian AH[3], Ghaznavi Rad E[4], Karimi M[5], Molaei N[6]

1- Assistant professor, PhD of department of microbiology and immunology, Arak University of Medical sciences, Arak, Iran.
2- MSc. Of Environmental Health, department of Health, Arak University of Medical sciences, Arak, Iran.
3- Associated professor, National Research Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.
4. Lecturer MSc. of Microbiology, department of microbiology and immunology, Arak University of Medical sciences, Arak, Iran.
5- BSc of Microbiology, department of microbiology and immunology, Arak University of Medical sciences, Arak, Iran.
6- BSc of Cell and Molecular Biology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received 25 Apr, 2008 Accepted 10 Sep, 2008

Abstract

Background: In molecular diagnosis of microbial agent, purification of chromosome is very important step. In this study, after cell destruction, DNA replication was done by increasing the denaturation time, without DNA purification.

Methods and Materials: In this experimental study eight different dilution of E.coli (8/100, 4/100, 2/100, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 and 1/1600) solution were madce in D.W, Bacteria were separated by filtration. Polymerase chain reaction method was used to propagate 162 rRNA gene by design primers without DNA Purification. In order to confirme sensitivity of PCR, contamination of 15 different sources of Arak well water wafer was compared by MPN method. For confirmed sensitivity of PCR, 15 sources of water in Arak were examined and compared with MPN method.

Results: Present of bacteria in diution sou tion were confirmed by culture. Polymerale Chain reaction (PCR) data were shown this method is able to recognize bacteria in above dilutions after filtration. This study showed high sensitivity of PCR method in compare to MPN method.

Conclusion: Results were shown without stages of extraction of DNA, PCR were done without losing chromosome. Therefore false negative results were decrease and avoided from difficult phases.

*Corresponding author;
Email: h_abtahi2@yahoo.co.uk
Address: Medicine faculty, Sardasht, Arak, Iran