Archive of SID

فصلنامه علمی پژوهشی میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی دوره ۲، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵، صفحات ۱ تا ۱۴

اندازه‌گیری کپک آسپرژیلوس نایجر در رب گوجه فرنگی به روش Real Time

رضا کاراژیان[۱]، محمد باقر حبیبی نجفی[۲]، مسعود یاورمنش[۳]، محمدرضا عدالتیان دوم[۴]، حمیدرضا پوریان فر[۵]

۱- گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی. پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی. جهاددانشگاهی مشهد. مشهد. ایران (نویسنده مسئول)*

۲- گروه علوم و صنایع غذایی. دانشکده کشاورزی. دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد. ایران

۳- گروه علوم و صنایع غذایی. دانشکده کشاورزی. دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد. ایران

۴- گروه علوم و صنایع غذایی. دانشکده کشاورزی. دانشگاه فردوسی مشهد. مشهد. ایران

۵- گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ های صنعتی. جهاددانشگاهی مشهد. مشهد. ایران

تاریخ دریافت:۱۳۹٤/۱۰/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۱٦

چکیده

در این تحقیق از روش مولکولی Real Time PCR برای اندازه‌گیری کپک *آسپرژیلوس نایجر* در رب گوجه فرنگی استفاده شد. به دلیل مشکلات روش شمارش کپک‌ها به روش Howard Method Count از قبیل احتمال خطای آزمون کننده، دقت کم و عدم تکرار پذیری، تبیین یک روش استاندارد که بتواند با دقت و تکرار پذیری بالا تشخیص و شمارش کپک‌ها را امکان پذیر سازد ضروری به نظر می‌رسد. روش مولکولی Real Time PCR می‌تواند به‌عنوان یک روش مناسب برای شناسایی و اندازه‌گیری کمی دقیق کپک‌ها مطرح باشد که بر مبنای اندازه‌گیری مطلق و نسبی ژن‌های کپک‌های موجود می‌باشد. نمونه‌های رب گوجه فرنگی با مقادیر مختلف اسپور کپک ($۱۰^{۱}$، $۱۰^{۳}$ و $۱۰^{۵}$) در هر گرم آلوده شد. پس از گرمخانه گذاری و رشد اسپور کپک و ایجاد میسیلیوم، استخراج DNA از هر نمونه با استفاده از روش al-sammari انجام شد. سپس با استفاده از واکنش Real Time PCR تعداد copy number مربوط به DNA کپک با استفاده از شناساگر سایبرگرین و پرایمرهای مربوط به جنس *آسپرژیلوس نایجر* تعیین شد. نتایج نشان داد که با افزایش مقدار DNA کپک در نمونه‌های شاهد و تلقیح شده منحنی Real Time در مقادیر C_T کمتری به فاز لگاریتمی وارد می شوند. ضریب همبستگی خطی منحنی استاندارد در آزمون Real Time $R^{۲}$=۰/۹۳۸ بود که نشان دهنده دقت تعیین کمی این آزمون می‌باشد. اختصاصی بودن واکنش با استفاده از منحنی ذوب پرایمرها تعیین شد و نشان داد که واکنش به طور کاملاً اختصاصی انجام شده است.

کلمات کلیدی: *آسپرژیلوس نایجر*، اندازه‌گیری، Real Time PCR

* reza_karazhyan2002@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گوجه فرنگی سرشار از ویتامین C و لیکوپن است. این محصول امروزه به طور خام یا فرآوری شده در رب گوجه فرنگی و انواع سس‌ها استفاده می‌شود و بخش مهمی از رژیم غذایی مردم بسیاری از کشورها را تشکیل می‌دهد. کپک‌ها گروهی از میکروارگانیسم‌ها هستند که قادرند به خوبی بر روی گوجه فرنگی و فرآورده‌های آن رشد کنند و با تولید سم سلامت مصرف کننده را به خطر اندازند. فلور کپکی گوجه فرنگی شامل جنس‌های متعددی از کپک‌ها می‌باشد. اغلب گونه‌های کپکی همراه با ماده خام در اثر فرآیندهای اعمال شده طی فرآوری رب از بین می‌روند اما بعضی از کپک‌هایی که دارای آسکوسپورهای مقاوم به حرارت هستند، می‌توانند در فرآورده‌های حاصل از میوه‌ها و سبزی‌ها ایجاد فساد کنند که از جمله مهم ترین آن‌ها جنس آسپرژیلوس می‌باشد (۱). جنس آسپرژیلوس از کپک‌های میکروسکوپی دارای دیواره است که به‌عنوان یکی از کپک‌های مهم آلوده کننده مواد غذایی می‌باشد و به دلیل قدرت بالای رشد در مواد غذایی و نیز قدرت تولید سموم میکروبی (قارچی) به خصوص آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی از اهمیت فراوانی برخوردار است (۲). این کپک در صورت وجود در رب گوجه فرنگی قادر به رشد و تولید توکسین می‌باشد. در روش استاندارد ایران و دنیا تعیین آلودگی کپکی این محصول به روش هوارد[1] انجام می‌شود. این روش بر پایه روش شناسایی مستقیم میسیلیوم کپک است و به دلیل مشاهده چشمی کپک‌ها و ریسه آن‌ها در زیر لام هوارد و احتمال خطای آزمون کننده، دقت کمی دارد و دارای انحراف معیار ۱۵ ٪ و بیشتر است (۳). علاوه بر این روش به مهارت شخص آزمون کننده نیز بستگی دارد. به دلیل خطاهای متعدد طی تشخیص کپک، نتایج آزمون یک نمونه در آزمایشگاه‌های مختلف متفاوت می‌باشد و نتایج حاصله قابلیت تکرار پذیری ندارند (۴). بنابراین تعیین یک روش استاندارد مبتنی بر روش‌های جدید مولکولی جهت تعیین دقیق میزان آلودگی کپکی این محصول لازم به نظر می رسد.

تکنیک Real-Time PCR از جمله روش‌های مولکولی بر پایه PCR می‌باشد که می‌تواند برای اندازه‌گیری مطلق و نسبی ژن‌های کپک‌های موجود مورد استفاده قرار گیرد. این تکنیک دارای دقت، تکرار پذیری، حساسیت و اختصاصت بالا بوده و قادر به شمارش کمّی سریع کپک‌ها می‌باشد. در تکنیک Real-Time PCR می‌توان مقدار کمّی ماده اولیه یک نمونه الگو را به صورتی بسیار اختصاصی، حساس و با قابلیت تکرار بالا، اندازه گرفت. این روش جایگزین مناسبی برای سایر اشکال PCR کمّی است که در آن‌ها مقدار محصول تکثیر شده نهایی، تعیین می گردد. مزیّت اصلی روش‌های مولکولی در شناسایی کپک‌ها نسبت به روش‌های غیر مولکولی این است که حتی یک سلول کپک نیز می‌تواند با این روش تشخیص داده شود، حال آن‌که در نمونه‌های دارای فلور میکروبی متنوع کپک در تعداد کم قادر به رشد نمی‌باشند. به علاوه برخی از کپک‌ها دارای رشد آهسته بوده و در رشد روی محیط کشت با مشکلاتی مواجه می‌باشند در حالی که در روش‌های مولکولی چنین مشکلی وجود ندارد. همچنین تعیین ویژگی کپک و نوع آن به روش‌های غیر مولکولی مرسوم شامل کشت روی محیط‌های اختصاصی ممکن است هفته‌ها به طول انجامد ولی ارزیابی به روش‌های مولکولی می‌تواند کمتر از یک ساعت به مورد اجرا گذاشته شود (۵). در این پژوهش اسپور کپک *آسپرژیلوس نایجر*[2] در مقادیر مختلف به رب گوجه فرنگی تلقیح شده و در دمای محیط نگهداری و سپس میزان میسیلیوم موجود در آن با استفاده از روش شمارش ریسه‌های کپک (HMC) و همچنین میزان DNA کپک نیز با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد. این تکنیک کاربردهای وسیعی در تشخیص بالینی و تحقیقات

[1] Howard Method Count (HMC)

[2] *Aspergillus niger*

www.SID.ir

Archive of SID

دارد. در این روش می‌توان یک توالی خاص را در DNA هدف‌گذاری، جستجو و شناسایی نمود و همچنین مقدار آن را در نمونه‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری کرد. در این تکنیک نیز اصول کلی PCR حاکم می‌باشد ولی نکته حائز اهمیت این است که پس از تکثیر DNA در هر سیکل، غلظت دقیق آن اندازه‌گیری می‌شود (۶). در PCR معمولی محصول تکثیر شده یا همان آمپلیکون[1] با یک آنالیز در end-point تشخیص داده می‌شود اما در واکنش Real-time این اجازه داده می‌شود که محصول تکثیر شده در طول پیشرفت واکنش تشخیص داده شده و به‌طور هم زمان مقدار محصول هم اندازه‌گیری شود، به همین دلیل Real-time نامیده می‌شود (۷,۶). در واکنش Real-time PCR به‌وسیله استفاده از مولکول‌های فلورسنت افزایش مقدار DNA را با نسبت افزایش در سیگنال فلورسنت نشان می‌دهند. مواد شیمیایی فلورسنت که برای این منظور به کار گرفته می‌شود شامل رنگ‌ها و توالی‌های نشان‌دار شده فلورسنس مخصوص یا پروب‌های نشان‌دار شده است که با DNA باند می‌شوند. میزان فلورسنس اندازه‌گیری شده بیان‌گر مقدار محصول تکثیرشده در هر سیکل می‌باشد (۷,۶). مهمترین مزیت Real-time PCR در مقایسه با PCR معمولی این است که Real-time PCR این اجازه را می‌دهد که تعداد کپی الگوی اولیه را با صحت، دقت و حساسیت بالا تعیین شود. همچنین نتایج Real-time PCR می‌تواند هم از نظر کیفی (وجود یا عدم وجود توالی خاصی) و هم از نظر کمی (تعداد کپی‌های DNA یا تعداد DNAهای موجود) مورد بررسی قرار گیرد. در این روش به این دلیل که واکنش ها در یک لوله انجام می‌شود (سیستم آزمایش بسته است). امکان آلودگی کاهش می‌یابد (۷,۶).

[1] Amplicon

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی رب گوجه فرنگی

جهت انجام این تحقیق احتیاج به رب گوجه فرنگی پاستوریزه بدون مواد افزودنی، نگهدارنده رنگ‌های خوراکی، نمک و غیره است تا از رشد غیر طبیعی کپک‌ها و یا بازدارندگی رشد آن‌ها جلوگیری شود. بدین منظور پس از تهیه گوجه فرنگی سالم، بدون کپک، آفت زدگی و لهیدگی استفاده شد و رب گوجه فرنگی با بریکس ۲۴ تا ۲۶ مشابه رب‌های تجاری موجود در بازار تهیه شد. محصول به‌دست آمده در ظروف شیشه‌ای درب دار قابل اتوکلاو استریل شده پر و بعد از درب بندی پاستوریزه شدند.

تهیه سوش کپک خالص

جنس کپک *آسپرژیلوس نایجر* (PTCC ۵۰۱۰) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌ها به صورت خالص و لیوفیلیزه تهیه شد.

فعال سازی کپک و تهیه نمونه‌ها

برای فعال‌سازی کپک‌های مورد نظر از محیط کشت مالت اکسترکت براث[2] استفاده شد. فعال سازی آمپول لیوفیلیزه شده کپک تحت شرایط کاملاً استریل و سترون شده طبق دستورالعمل سازنده انجام گردید. از سوسپانسیون محیط کشت و کپک تلقیح شده در لوله بعد از گذشت چند ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۲۵°C در محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار[3] به صورت خطی کشت داده شد. پلیت ها در دمای ۲۵°C به مدت ۵ تا ۷ روز گرمخانه گذاری شدند تا کلنی‌های کپک ظاهر شده رشد کرده و میسلیوم تولید کند (۸).

تلقیح کپک به رب گوجه فرنگی

برای این منظور با آنس استریل از اسپور کپک رشد کرده روی سطح محیط کشت برداشته و به‌وسیله محلول

[2] Malt Extract Broth
[3] Potato Dextrose Agar

www.SID.ir

Archive of SID

رینگر رقیق شد. توسط لام هموسایتومتر تعداد اسپورهای کپک سوسپانسیون شده در داخل رینگر محاسبه شد (10^8 تا 10^9 عدد اسپور در هر میلی لیتر). سپس رقت های مختلف اسپور (10^1، 10^3 و 10^5) در هر گرم تهیه شده و به رب اضافه و به مدت 72h ساعت در 25°C گرمخانه گذاری شدند تا اسپورها فرصت ایجاد فرم میسیلیومی را پیدا کنند و بتوان از نمونه‌های رب آلوده شده حاصله استخراج DNA را انجام داد.

استخراج DNA از میسیلیوم کپکی

در این تحقیق از روش بهینه شده السامرایی و همکاران[1] (۲۰۰۰) استفاده شد (۹). به‌طور خلاصه عمل استخراج به شرح ذیل می‌باشد:

نمونه‌های رب آلوده شده با کپک توسط ازت مایع به‌وسیله کوبیدن در هاون استریل به صورت پودر در آمدند. ۵۰ تا ۷۰mg از پودر به میکروتیوپ منتقل شده و ۶۰۰µl بافر استخراج گرم شده (۲٪ CTAB- ۱۰۰ mM Tris-HCl (pH=۸)- ۲۰ mM EDTA- ۱/۴ M NaCl- ۳٪ PVP- ۰/۲٪ Mercaptoethanol) به آن اضافه شد. سپس در 62 °C به مدت 30 min حرارت داده شد. سپس 1 µl پروتئیناز k به مخلوط اضافه شده و در 37 °C به مدت 30 min گرمخانه گذاری گردید. سایر مراحل استخراج مطابق روش انجام شد و در نهایت DNA توسط اتانول رسوب داده شد. اتانول دور ریخته شده و رسوب حاصله در انتهای تیوپ در دمای اتاق خشک شد. به رسوب خشک شده 50 µl آب دیونیزه اضافه شد و به مدت یک شب در 4°C نگهداری شد. پس از انجام عمل استخراج، DNA حاصله به مدت یک شب در دمای ۱۸°C- نگهداری شدند و سپس کمیت و کیفیت DNA استخراج شده توسط روش اسپکتروفتومتری و جذب محلول DNA استخراجی در طول موج 260 nm، 280 و 320 و همچنین نسبت جذب 260/280 nm ، الکتروفورز بر روی ژل آگارز و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای پیش رونده و پس رونده (جدول ۱) مورد بررسی قرار گرفت. شرایط واکنش PCR مطابق جدول (۲) انجام گرفت.

پرایمرها و برنامه سیکل حرارتی PCR

در طراحی پرایمرها برای کپک مورد آزمون آسپرژیلوس نایجر پرایمرهای کاملاً اختصاصی (species-specific) بر مبنای نواحی کاملاً محافظت شده[2] از هر گونه مورد نظر از ناحیه ITS و srDNA ۱۸ و ژن بتاتیوبولین[3] کپک مورد نظر از اطلاعات موجود بانک ژنی[4] و با لحاظ کردن چگونگی طراحی پرایمر جهت آزمون Real Time که در آزمون PCR نیز مفید باشد انجام شد (۱۰-۱۵). طراحی پرایمرها با استفاده از نرم افزار Allele ID انجام گرفت. توالی‌های پرایمرهای پیش رونده و پس رونده در جدول (۱) آورده شده است. سفارش سنتز پرایمرها با توالی‌های مذکور به شرکت بیونیر[5] کره جنوبی داده شد.

جدول(۱): توالی نوکلیوتیدی جفت پرایمرهای مورد استفاده در آزمون PCR

پرایمر	توالی نوکلیوتیدی پرایمرهای پیش رونده و پس رونده ′۳→′۵
آسپرژیلوس نایجر (پیش رونده)	TGTTTCTATTATGACCCGTTCGG
آسپرژیلوس نایجر (پس رونده)	CCCCGTGTTGAGTCAAATTAAGC

[1] Al-samarrai

[2] conserve
[3] β-Tuboline
[4] NCBI
[5] Bioneer

www.SID.ir

Archive of SID

جدول (۲): برنامه زمانی (سیکل حرارتی) واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

نام مرحله	درجه حرارت (°C)	زمان (min)	تعداد سیکل
شروع	۹۴	۱۰	۱
واسرشت	۹۴	۰/۵	۴۰
اتصال	۵۲-۵۵	۰/۵	۴۰
طویل شدن	۷۲	۲	۴۰
طویل شدن نهایی	۷۲	۵	۱

اندازه‌گیری مقدار DNA کپی شده در هر کدام از جدایه‌ها به روش سایبرگرین

واکنش Real Time با استفاده از دستگاه HRM compatible Real-Time PCR مدل بیوراد[۱] انجام شد. قبل از شروع کار، برنامه کاری زمان - دما (جدول ۳) به دستگاه Real-Time PCR داده شد. سپس تعداد نمونه، تکرارهای لازم، ترتیب چیدمان نمونه‌ها، درجه حرارت، تعداد و زمان هر سیکل PCR و نوع مولکول گزارش‌گر (سایبرگرین) با دقت تعیین شد. جهت بررسی اختصاصی بودن C_T به دست آمده از بیان هر DNA، منحنی ذوب رسم گردید.

جهت رسم منحنی ذوب دستگاه دما را از ۵۵ تا ۹۵ °C با شیب ۰/۵ °C در هر ۰/۰۵ s افزایش داد (۱۱, ۱۴-۱۶). در پایان کار تمامی اطلاعات مربوط به تعداد کپی قالب های DNA، C_T و منحنی ذوب آن‌ها به‌دست آمد. با توجه به C_T مربوط به بیان هر قالب DNA و بازده آغازگرها آنالیز داده‌ها صورت گرفت.

در شکل (۱) برنامه دما- زمان واکنش Real- PCR Time به روش سایبرگرین که توسط دستگاه داده شده آورده شده است.

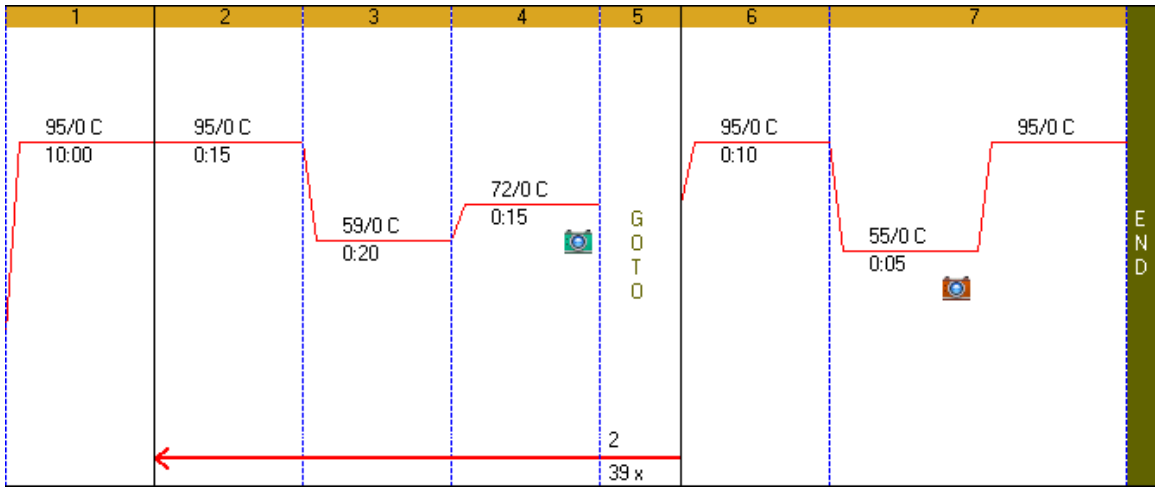
جدول (۳): برنامه دما-زمان واکنش Real-Time PCR به روش سایبرگرین

مرحله	درجه حرارت (°C)	مدت زمان	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۱۰ min	۱
واسرشت سازی	۹۵	۱۵ sec	
اتصال پرایمرها	۵۹	۲۰ sec	۳۹
سنتز قطعه مورد نظر	۷۲	۱۵ sec	

[۱] Bio-Rad

www.SID.ir

Archive of SID



شکل (۱): برنامه دما-زمان واکنش Real-Time PCR به روش سایبرگرین

بـه منظـور انجـام Real-Time PCR از پرایمرهـای پیش‌رونده و پس‌رونده بـرای کپـک مـورد اسـتفاده کـه در جدول (۲) آورده شده است استفاده شد.

برای انجام واکنش Real-Time PCR حجم نهایی هـر محلول واکنش ۲۰ µl در نظر گرفته شد. برای دقت بیش‌تـر و تسهیل کار حجم واکنش‌گرهای مورد نیاز هـر پرایمـر در تعـــداد میکروتیـــوب‌هـــای آن ضـــرب گردیـــد.

برای سهولت در کار از مستر میکس سایبرگرین[1] سـاخت شـرکت پـارس تـوس اسـتفاده شـد. پـس از سـاخت Master mix از این محلول به هر میکروتیوب به میزان لازم اضافه و سپس به تمامی میکروتیوب‌ها به جـز نمونـه کنتـرل منفی، ۲µl از DNA مورد نظر اضافه گردید. مواد لازم برای واکنش و حجم هر یک در جدول (۴) آورده شده‌اند.

جدول(٤): مخلوط و حجم واکنش‌گرها جهت انجام Real-Time PCR به روش سایبرگرین

واکنشگرها	حجم (µl)	غلظت
آب مقطر	۶	–
مستر میکس سایبرگرین	۱۰	۲ X
پرایمر پیش رونده	۱	۱۰ Pmol
پرایمر پس رونده	۱	۱۰ Pmol
DNA الگو	۲	–
حجم نهایی	۲۰	

[1] SYBR Green Real Time PCR Master Mix

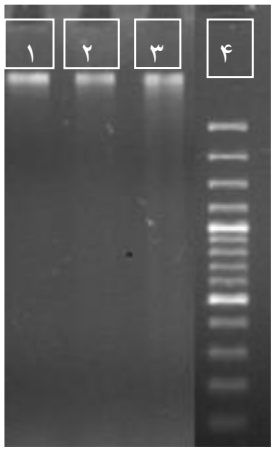
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

نتـــایج الکتروفـــورز ژل DNA حاصـــل از روش Al-samarrai

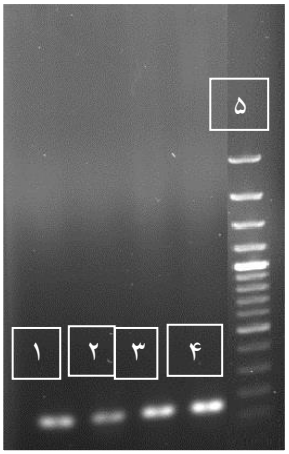
نتـایج الکتروفـورز ژل DNA به‌دسـت آمـده از روش السـامرایی در شـکل (۲) نشـان داده شـده اسـت. ارزیـابی باندهای حاصل برای تمام جدایه‌های حاصـل از ایـن روش استخراج حاکی از وجود باندهای مشخص فاقد شکستگی و هاله در تمامی جدایه‌ها می‌باشد. نتایج الکتروفورز ژل نشـان می دهد که اسـتخراج بـا ایـن روش DNA هـای مناسـبی را جدا کرده است.



شکل (۲): الکتروفورز ژل DNA استخراج شده کپک *آسپرژیلوس نایجر*
به ترتیب عبارتند از ۱- $Aspergillus\ 10^1$ ۲- $Aspergillus10^3$ ۳- $Aspergillus10^5$ ٤- Ladder

الکتروفورز ژل محصول PCR نمونـه‌هـای DNA استخراج شده با روش السامرایی

نتایج الکتروفورز محصـول PCR جدایـه‌های حاصـل از روش استخراج السامرایی شکل (۳) نشان می‌دهد که تمامی جدایـه‌های حاصـل از ایـن روش بـر روی ژل بانـد ایجـاد کـرده‌انـد بـه طـوری کـه طـول بانـد محصـول PCR برای *آسپرژیلوس نایجر* ۱۵۰bp بوده که بـر روی ژل کـاملاً مشخص است که همه جدایه‌ها باند کاملاً روشن و مشخص بر روی ژل ایجاد کرده انـد. نتـایج بیـان کننـده ایـن مطلـب است که ممانعت کننده‌های PCR را به طور کامل از محیط عمل خارج شده است.



شکل(۳): الکتروفورز ژل محصول PCR نمونه‌های DNA استخراج شده
به ترتیب عبارتند از ۱- $Aspergillus$ ۲- $Aspergillus10^1$ ۳- $Aspergillus10^3$ ٤- $Aspergillus10^5$ ٥- Ladder

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش Real Time به منظور اندازه‌گیری مقدار DNA کپی شده در هر کدام از جدایه‌ها به روش سایبرگرین

به منظور اندازه‌گیری کمی میزان *آسپرژیلوس نایجر* در نمونه‌های رب آلوده شده با مقادیر مختلف اسپور این کپک از روش Real-Time PCR مطلق استفاده گردید. در این روش غلظت نمونه‌های مجهول بر اساس مقایسه آن‌ها با منحنی استاندارد تعیین شد. به منظور رسم منحنی استاندارد ابتدا از محصول PCR مربوط *به آسپرژیلوس نایجر* استفاده شد.

در مرحله بعد از این محلول، رقت‌های پشت سر هم (10^{1}-10^{8}) تهیه گردید و مقادیر کمی از آن‌ها در واکنش Real-Time PCR با جفت پرایمرهای مربوطه به منظور رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. این منحنی یک ارتباط خطی بین سیکل آستانه و مقدار اولیه DNA و DNA مجهول ایجاد می‌نماید. در نهایت بر اساس مقادیر سیکل آستانه نمونه‌های مجهول و مقایسه آن‌ها با منحنی استاندارد، غلظت نمونه‌های مجهول تعیین شد. همه واکنش‌ها در دو تکرار انجام پذیرفت. غلظت‌های استاندارد به‌کار گرفته شده در آزمون Real Time PCR با استفاده از محصول PCR کلون شده و خالص شده هر جنس کپک تهیه شد. به این منظور از DNA کلون شده هر جنس رقت‌های متوالی با استفاده از آب دیونیزه تهیه شده و به‌عنوان غلظت‌های استاندارد در آزمون‌های Real Time PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

در جدول (۵) مقادیر C_T و مقادیر کمی DNA های استاندارد و مجهول مربوط به کپک *آسپرژیلوس نایجر* حاصل از واکنش Real-Time PCR مطلق به روش سایبرگرین آورده شده است.

جدول (۵): مقادیر C_T و مقادیر کمی DNA های استاندارد و مجهول مربوط به کپک *آسپرژیلوس نایجر* حاصل از واکنش Real-Time PCR مطلق به روش سایبرگرین

نمونه	Ct±SD	مقدار DNA (ng)
استاندارد ۱	۱۷/۱۴ ± ۰/۰	1×10^{8} ± ۰/۰
استاندارد ۲	۱۸/۱۶ ± ۰/۱۲۳	1×10^{7} ± ۰/۰
استاندارد ۳	۲۳/۱۶ ± ۰/۰	1×10^{6} ± ۰/۰
استاندارد۴	۲۴/۰۶ ± ۰/۰۳	1×10^{5} ± ۰/۰
استاندارد ۵	۲۷/۰۷ ± ۱/۱۱۵	1×10^{3} ± ۰/۰
نمونه ۱	۲۹/۰۱ ± ۱/۰۰۳	$2/86\times10^{2}$ ± $2/63\times10^{2}$
نمونه ۲	۲۵/۷۲ ± ۰/۰۲۹	$7/95\times10^{3}$ ± $2/50\times10^{2}$
نمونه ۳	۲۳/۰۷ ± ۰/۱۴۶	$1/47\times10^{5}$ ± $2/34\times10^{4}$

جدول (٦): مقادیر DNAهای استاندارد به کار رفته در جدول (۵)

استاندارد	استاندارد ۱	استاندارد ۲	استاندارد ۳	استاندارد ۴	استاندارد ۵
مقدار DNA آسپرژیلوس	10^{8}	10^{7}	10^{6}	10^{5}	10^{3}

www.SID.ir

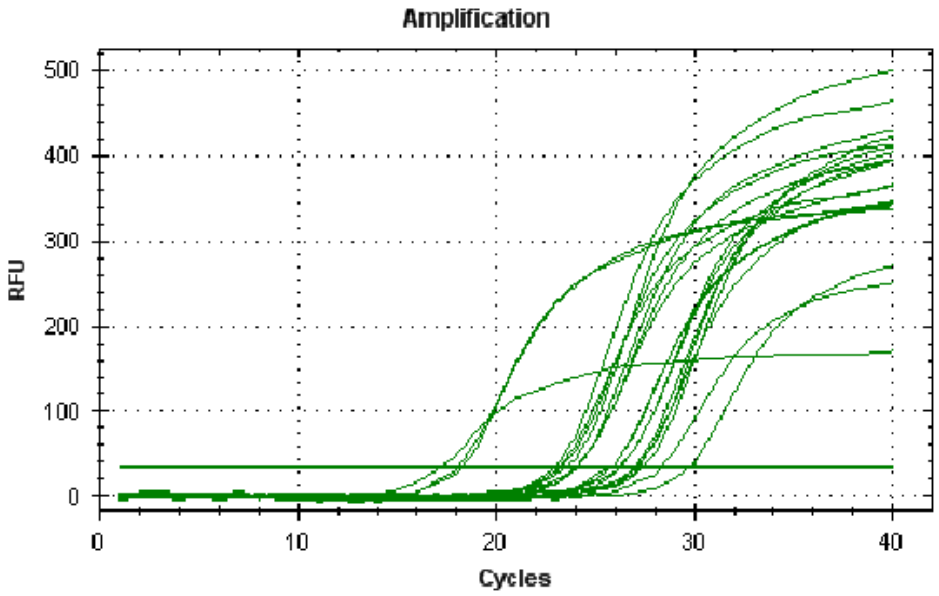
Archive of SID

استانداردهای ۱ تا ۵ DNA های کلون شده و رقیق شده با مقدار معلوم می‌باشد که شرح آن در قسمت قبل آورده شد. همان طور که از نتایج جدول (۵) مشخص می‌باشد این است که با افزایش مقدار DNA در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های مجهول سیکل آستانه (C_t) مربوط به آن‌ها کاهش یافته است و این بدان معناست که با افزایش مقدار DNA شدت نور فلورسانس افزایش یافته و در سیکل‌های کمتری از PCR به فاز لگاریتمی می‌رسند.

جدول(۷): مقادیر DNA در نمونه‌های ذکر شده در جدول ۵

نمونه	۱ (ng)	۲ (ng)	۳ (ng)
مقدار DNA آسپرژیلوس	Aspergillus$۱۰^{۲}$	Aspergillus$۱۰^{۴}$	Aspergillus$۱۰^{۶}$

شکل(۴) روند تکثیر محصول Real-Time PCR نمونه‌های استاندارد و مجهول کپک *آسپرژیلوس نایجر* را در هر سیکل نشان می‌دهد.



شکل(٤): روند تکثیر *آسپرژیلوس نایجر* در هر سیکل آزمایش Real-Time PCR.
محور عمودی: میزان فلورسانس ساطع شده، محور افقی: سیکل‌های واکنش

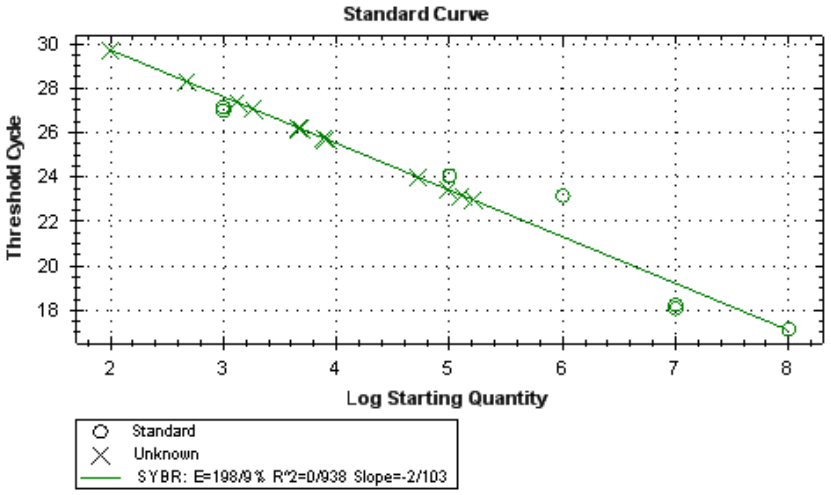
در شکل (۵) منحنی استاندارد که از رسم مقادیر C_T در مقابل لگاریتم غلظت هر یک از DNAهای رقیق شده از نمونه استاندارد مربوط به کپک *آسپرژیلوس نایجر* به‌دست آمده، مشاهده می‌شود. ضریب همبستگی خطی منحنی استاندارد ($R^{۲}$=۰/۹۳۸) به‌دست آمد که نشان‌دهنده دقت تعیین کمّی بر پایه Real-Time PCR می‌باشد.

از جمله ویژگی‌ها و مزایای Real-Time PCR ترسیم منحنی ذوب است که این عمل پس از اتمام فرآیند PCR

www.SID.ir

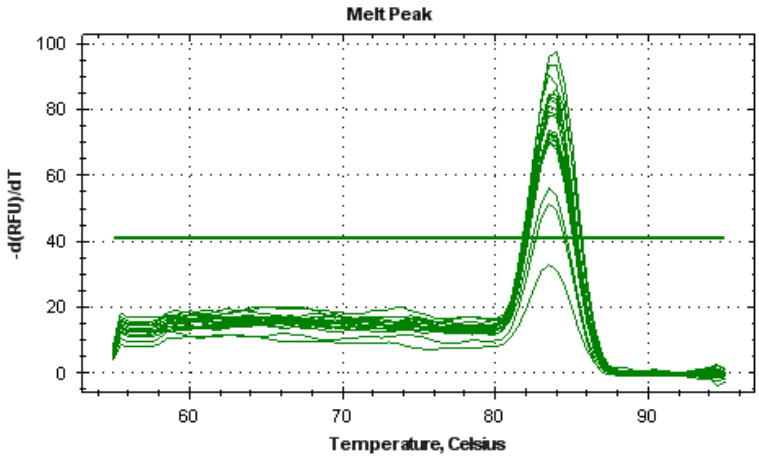
Archive of SID

انجام می‌شود. دمای ذوب DNA یک پارامتر ویژه برای این مولکول می‌باشد و به ساختمان DNA و عواملی نظیر طول و تعداد نوکلیوتید، میزان نمک محیط و درصد GC بستگی دارد. از آن‌جا که سایبرگرین نمی‌تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قایل شود، می‌توان با استفاده از منحنی ذوب تنوع محصولات را در فرآیند PCR مشخص کرد.



شکل(۵): منحنی استاندارد *آسپرژیلوس نایجر* در آزمایش Real-Time PCR.
محور عمودی: مقادیر Ct، محور افقی: لگاریتم غلظت DNA بر حسب نانوگرم

از جمله ویژگی‌ها و مزایای Real-Time PCR ترسیم منحنی ذوب است که این عمل پس از اتمام فرآیند PCR انجام می‌شود. دمای ذوب DNA یک پارامتر ویژه برای این مولکول می‌باشد و به ساختمان DNA و عواملی نظیر طول و تعداد نوکلیوتید، میزان نمک محیط و درصد GC بستگی دارد. از آن‌جا که سایبرگرین نمی‌تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قایل شود، می‌توان با استفاده از منحنی ذوب تنوع محصولات را در فرآیند PCR مشخص کرد.



شکل(٦): منحنی ذوب *آسپرژیلوس نایجر* در آزمایش Real-Time PCR.
محور عمودی: میزان فلورسانس ساطع شده، محور افقی: درجه حرارت بر حسب سانتی‌گراد

www.SID.ir

Archive of SID

همانطور که شکل (۶) مشاهده می‌شود پیک اضافی کوچک‌تر از پیک محصولات که نشانگر وجود پرایمر دایمر می‌باشد، موجود نبوده و این نشانگر آن است که پرایمرها تقابلی با هم نداشته‌اند. از آن‌جا که پرایمر دایمرها قطعات کوچک‌تری نسبت به محصول اصلی تولید می‌کنند بنابراین دمای ذوب پایین‌تری نسبت به محصول اصلی دارند در نتیجه منحنی ذوب پرایمر دایمرها کوچک‌تر و قبل از منحنی ذوب محصول اصلی می‌باشد. درصورتی که محصولی به صورت غیر اختصاصی تکثیر شود، دمای ذوب آن بالاتر از محصول اصلی بوده و منحنی ذوب بعد از منحنی ذوب محصول اصلی مشاهده می‌گردد. منحنی ذوب مناسب دارای ویژگی‌هایی نظیر کشیده و نوک تیز بودن است، همچنین منحنی ذوب تکرارهای یک نمونه کاملاً بر روی هم قرار می‌گیرند که در شکل (۶) مشاهده می‌شود.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهند که روش به‌کار گرفته شده برای استخراج DNA کپک از رب گوجه فرنگی مناسب است این بدان علت است که این روش قادر به حذف مواد و ترکیبات مزاحم و اضافی از قبیل حلال‌ها و پروتئین‌ها می‌باشد. وجود هاله شفاف و بدون شکستگی در الکتروفورز ژل نمونه‌های DNA استخراج شده در غلظت‌های مختلف این مطلب را تایید می‌کند. همچنین در این روش کلیه ممانعت کننده‌های PCR از محیط عمل خارج شده است و الکتروفورز ژل محصول PCR این مطلب را تایید می‌کنند. طراحی پرایمرهای پیش‌رونده و پس‌رونده جهت عملیات PCR و Real Time PCR از ناحیه ITS و ۱۸srDNA انجام شد. ساردیناس[1] و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از روش Real Time کمی با استفاده از سایبرگرین مقدار کپک‌های *آسپرژیلوس فلاووس*[2] و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*[3] را در آرد گندم تعیین کردند. در این تحقیق از پرایمرهای ناحیه ITS ریبوزومی به‌عنوان هدف استفاده شد. حساسیت آزمون pg ۵/ ۲ در هر واکنش برای هر دو گونه بود (۱۵). کاستلا[4] و همکاران (۲۰۱۱) برای تشخیص گونه‌های تولید کننده اکراتوکسین *آسپرژیلوس نایجر* از روش Real Time PCR استفاده کردند. با استفاده از دو روش سایبرگرین و تک من می‌توان گونه‌های *آسپرژیلوس نایجر* تولید کننده اکراتوکسین[5] را شناسایی کرد (۱۴). گیل سرنا[6] و همکاران (۲۰۰۹) مقادیر کمی کپک‌های *آسپرژیلوس اکراسوس*[7] و *آسپرژیلوس وستردیجکیا* را در انگور و دانه‌های سبز قهوه با روش Real Time کمی اندازه‌گیری کردند. مبنای شناسایی بر پایه ناحیه ITS ریبوزومی می‌باشد. آزمون Real-Time با استفاده از سایبرگرین انجام شد و پرایمرهای طراحی شده بر پایه تکرار توالی‌های مشخص در ناحیه ITS1 ناحیه ریبوزومی انتخاب شد. طراحی پرایمرها بر پایه ناحیه ۵/۸ S1 و ۵/۸ S2 از گونه‌های کپک‌های مورد نظر انجام شد (۱۳). واکنش Real Time PCR جهت اندازه‌گیری میزان کمی کپک آسپرژیلوس با استفاده از روش سایبرگرین انجام شد. ساردیناس (۲۰۱۱)، کاستلا (۲۰۱۱) و رودریگویز (۲۰۱۱)[8] برای اندازه‌گیری مقدار کپک‌های تولید کننده توکسین در مواد غذایی از این روش استفاده کردند. نتایج نشان داد که با افزایش DNA کپک در نمونه‌ها شدت نور فلورسانس افزایش یافته و در سیکل‌های کمتری وارد فاز لگاریتمی می‌شوند. همچنین در این مطالعات همبستگی مناسبی بین میزان نور فلورسنت و میزان کپک‌ها وجود داشته است به طوری که ضریب همبستگی (R^2=۰/۹) داشته‌اند. آزمون Real Time PCR با استفاده

[1] Sardinas
[2] *Aspergillus flavus*
[3] *Aspergillus parasiticus*
[4] Castella
[5] Ochratoxin
[6] Gil, serna
[7] *Aspergillus ochraceus*
[8] Rodríguez

www.SID.ir

Archive of SID

از سایبرگرین یک آزمون اندازه‌گیری کمی است که با افزایش میزان DNA کپک میزان نور فلورسنس افزایش می‌یابد این مطلب در نتایج به‌دست آمده در این تحقیق در جدول (۵) و همچنین شکل (۴) تایید شده است. همچنین با استفاده از منحنی نقطه ذوب DNA در شکل (۶) مشخص شد که DNA استخراج شده به طور کاملاً اختصاصی تکثیر شده است و DNA اضافی و همچنین پرایمر دایمرها در جدایه‌های استخراج شده وجود نداشته است. محققین مذکور نتایج مشابهی در تحقیقاتشان در خصوص اندازه-گیری میزان کپک در مواد غذایی انتخاب شده گرفتند.

کاستلا و همکاران (۲۰۱۱) برای تشخیص گونه‌های تولید کننده اکراتوکسین *آسپرژیلوس نایجر* از روش Real Time PCR استفاده کردند. در این تحقیق، هدف شناسایی وجود ژن تولید کننده اکراتوکسین در جدایه‌های *آسپرژیلوس نایجر* گرفته شده از مواد غذایی روش مولکولی Real Time این امکان را فراهم می‌کند که با شناسایی ژن‌های تولید کننده توکسین در کپک و تشخیص این ژن‌ها در ماده غذایی آلوده به کپک، می‌توان احتمال آلودگی ماه غذایی به توکسین را پیشگویی و تعیین کرد. با استفاده از دو روش سایبرگرین و تک من[1] می‌توان گونه‌های *آسپرژیلوس نایجر* تولید کننده اکراتوکسین را شناسایی کرد (۱۴).

رودریگویز[2] و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از روش Real Time PCR، مقدار کمی کپک‌های تولید کننده اکراتوکسین A را در مواد غذایی به دو روش سایبرگرین و پروب تک من اندازه‌گیری کردند. اکراتوکسین A (OTA) یک نوع مایکوتوکسین است که به‌وسیله کپک‌های مختلف که بیشتر از جنس پنی سیلیوم و آسپرژیلوس هستند تولید می‌شوند. در این تحقیق، میزان کمی کپک‌ها با دو پروتکل سایبر گرین و تک من تعیین شده است. در هر دو روش ارتباط و همبستگی خوبی بین میزان نور فلورسنت و میزان کپک‌ها وجود دارد (۱۷).

نیکولایسن[3] و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از فاکتور طویل شدن و ژن (EF1α) ۱۱ گونه فوزاریوم بر روی ۲۴ نمونه گندم و ۲۴ نمونه ذرت با استفاده از آزمون Real Time PCR تعیین مقدار کردند. در این تحقیق، با استفاده از این روش، اطلاعات دقیقی از نمونه‌های تولید کننده مایکوتوکسین به دست آمده اند (۱۸).

منابع

۱- الهامی راد ا.ح.، شهیدی ف. ارزیابی تغییرهای فیزیکوشیمیایی و میکروبی رب گوجه فرنگی فله در طی نگهداری در سردخانه، مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۸،۱۳۸۳(۴):۲۲-۳۰.

2-Motkova P and vytrasova J. Compariosn of methods for isolating Fungal DNA. Czech Journal of food Science. 2011, 29: 76-85

3-Noterman S and Heuvelman J.C. Immunological detection of moulds in food by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) preparation of antigens. International journal of food microbiology. 1985, 2(5): 247-258

4-Alastair R, Naresh p, James G. Immunofluorescence detection of mould – an aid to the Howard mould counting technique. Journal of food microbiology. 1988, 5(8): 33-42

5-Niessen L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. International Journal of Food Microbiology. 2007.119(3): 38–46.

6-Orlando C, Pinzani, P and Pazzagli, M. Developments in quantitative PCR. Journal of clinical chemistry laboratory medicine. 1998, 36(12): 255-269.

7-Bustin, SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of molecular endocrinology. 2002. 29(6): 23-39.

8-Jin J, lee Y, wickes BL. simple chemical extraction method for DNA isolation from *aspergillus fumigatus* and other aspergillus species. Journal of clinical microbiology. 2004; 42 (9): 4293-4296.

[1] TaqMan
[2] Rodríguez
[3] Nicolaisen

www.SID.ir

Archive of SID

9-Al-samarrai TH, Schmid J. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. Letters in applied microbiology. 2000, 30: 53-56.

10-Logotheti L, Kotsovili- Tseleni A, Arsenis G, Legakis N.I. Multiplex PCR for The discrimination of A. fumigates, A. flavus ,A.nigar and A. terreus. Journal of microbiological methods. 2009, 76(45): 209-211.

11-Suanthie Y, Cousin M.A, Woloshuk C.P. Multiplex real-time PCR for determination and quantification of mycotoxigenic *Aspergillus, Penicillium* and *Fusarium*. Journal of stored products Research. 2009, 45-139-14

12- Goebes MD, Hildemann LM, Kujundzic E, Hernandez M. Real-time PCRfor detection of the Aspergillus genus. Journal of Environmental Monitoring. 2007, 9(10) 599–609.

13-Gil serna J, Gonzales-salgado A, Gonzales-Jaen M.T, Vasquez C, patino B. ITS-based detection and quantification of *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae* in grapes and coffee beans by real-time quantitative PCR. International Journal of food microbiology. 2009, 131: 162-167

14- Castellá G, Cabañes FJ. Development of a real time PCR system for detection of Ochratoxin A-producing strains of the *Aspergillus niger* aggregate. Journal of food control. 2011, 22(8):1367-1372

15- Sardinas N, Vazquez C, Gill-serna J, Gonzalez-Jaen M.T, Patino B. Specific detection and quantification of *Asprgillus flavous* and *Aspergillus parasiticus* in wheat flour by SYBR Green quantitative PCR. International Journal of food microbiology. 2011, 145:121-125.

16- Morello LG, Sartori D, Martinez AL, Vieira ML, Taniwaki MH, Fungaro MH. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selectiove amplification of β-tubulin gene by using real-time PCR. International Journal of food microbiology. 2007, 119(93)270-276.

17- Rodríguez A, Rodríguez M, Luque MI, Justesen AF, Córdoba JJ. Quantification of ochratoxin A- producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR- product .International Journal of Food Microbiology. 2011, 149(3): 226-235.

18- Nicolaisen M, Supronine S, Nielsen LK, Lazzaro I, Spliid NH, Justesen, AF. Real-time PCR for quantification of eleven individual fusarium species in cereals. Journal of microbiological methods. 2009, 76(3):234-240.

www.SID.ir

Archive of SID

Aspergillus niger measurement in tomato paste using Real Time

Reza karazhyan[1], Mohammad B. Habibi Najafi[2], Masoud Yavarmanesh[3], Mohammad Reza Edalatian[4], Hamid R. Pourianfar[5]

1- Member of scientific staff. Food quality and safety research department. Food science and technology research institute (correspond author)*

2- Ferdowsi University of Mashhad Faculty of Agriculture Department of Food Science & Technology

3- Ferdowsi University of Mashhad Faculty of Agriculture Department of Food Science & Technology

4- Ferdowsi University of Mashhad Faculty of Agriculture Department of Food Science & Technology

5- Iranian Academic Centre for Education, Culture and Research (ACECR)-Mashhad Branch

Received: 1394/10/12
Accepted: 1395/02/16

Abstract

In this study, molecular method used to measure the *Aspergillus niger* with Real Time PCR technique in tomato paste. Because of problems mold count method such as proofer error, low and non-repeatability precision, accuracy and repeatability, developing a standard method high accuracy and repeatability and mold counts seems necessary. Real Time PCR molecular method can be used as a suitable method to identify and quantify the precise mold is considered based on the measurement of absolute and relative genes existing molds. Tomato paste samples with different amounts of mold spores (10^1, 10^3 and 10^5) per gram were contaminated. After incubation and growth of spores and mycelium of mold, DNA extraction from each sample was performed using al-sammari method. Then, using Real Time PCR reaction of DNA copy number of molds using SYBR Green reagent and primers of the *Aspergillus niger* genus was determined. The results showed thatby increasing amount of DNA molds in controls and inoculated samples Real Time curve were entered logarithmic phase in the lower C_T values. The correlation coefficient of linear calibration Real Time was R^2 = 0/938 which indicates that the accuracy of this test is quantitative detection. The reaction specificity was determined using melting curve of the primers and indicated that the reaction has been completely dedicated.

Key words: *Aspergillus niger*, quantification. Real Time PCR.

* *reza_karazhyan2002@yahoo.com*

www.SID.ir