Archive of SID

ارزیابی روش Real Time در اندازه گیری *رایزوپوس اوریزا* در رب گوجه فرنگی

رضا کارازیان[۱*]، محمد باقر حبیبی نجفی[۲]، مسعود یاورمنش[۲]، محمدرضا عدالتیان دوم[۲]، حمیدرضا پوریان فر[۳]

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 پژوهشی زیست فناوری قارچ های صنعتی، جهاددانشگاهی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

در این تحقیق از روش مولکولی Real Time PCR برای اندازه گیری کپک *رایزوپوس اوریزا* در رب گوجه فرنگی استفاده شد. به دلیل مشکلات روش شمارش کپک‌ها به روش شماره نسبی کپک‌ها 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 به عنوان یک روش مناسب برای شناسایی و اندازه‌گیری کمی دقیق کپک‌ها مطرح باشد که بر مبنای اندازه‌گیری مطلق و نسبی ژن‌های کپک‌های موجود می‌باشد. نمونه های رب گوجه فرنگی با مقادیر مختلف اسپور کپک (10^1، 10^3 و 10^5) 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 السامرایی انجام شد. سپس با استفاده از واکنش PCR تعداد کپی DNA کپک با استفاده از شناساگر سایبرگرین و پرایمرهای مربوط به جنس *رایزوپوس اوریزا* تعیین شد. نتایج نشان داد که با افزایش مقدار DNA کپک در نمونه‌های شاهد و تلقیح شده منحنی Real Time PCR در مقادیر C_T کمتری به فاز لگاریتمی وارد می شوند. ضریب همبستگی خطی منحنی استاندارد در آزمون Real Time PCR (R^2=۰/۹۴۳) بود که نشان دهنده‌ی دقت تعیین کمی این آزمون می‌باشد. اختصاصی بودن واکنش با استفاده از منحنی ذوب پرایمرها تعیین شد و نشان داد که واکنش به طور کاملا اختصاصی انجام شده است.

کلمات کلیدی: کپک ، مقدار کمی، سایبرگرین

* reza_karazhyan2002@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کپک‌ها گروهی از میکروارگانیسم‌ها هستند که قادرند به خوبی بر روی گوجه فرنگی و فرآورده‌های آن رشد کنند و با تولید توکسین، سلامت مصرف کننده را به خطر اندازند. این محصول امروزه به طور خام یا فراوری شده در رب گوجه فرنگی و انواع سس‌ها استفاده می‌شود و بخش مهمی از رژیم غذایی مردم بسیاری از کشورها را تشکیل می‌دهد. فلور کپکی گوجه فرنگی شامل جنس های متعددی از کپک‌ها می باشد. اغلب گونه‌های کپکی همراه با ماده خام در اثر فرآیندهای اعمال شده طی فرآوری رب از بین می‌روند اما بعضی از کپک-هایی که دارای آسکوسپورهای مقاوم به حرارت هستند می توانند در فراورده‌های حاصل از میوه‌ها و سبزی‌ها ایجاد فساد کنند که یکی از مهم ترین آن‌ها جنس رایزوپوس می‌باشد (۱).

جنس رایزوپوس از کپک‌های میکروسکوپی فاقد دیواره سلولی و دارای رشد سریع می باشد که به عنوان یکی از کپک-های مهم آلوده کننده مواد غذایی می‌باشد و به دلیل قدرت بالای رشد در مواد غذایی از اهمیت فراوانی برخوردار است (۲). این کپک در صورت وجود در رب گوجه فرنگی قادر به رشد و ایجاد آلودگی می‌باشد.

در روش استاندارد ایران و دنیا تعیین آلودگی کپکی این محصول به روش هوارد[1] (HMC) 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 احتمال خطای آزمون کننده وجود دارد، دقت کمی دارد و دارای انحراف معیار ۱۵ درصد و بیشتر است (۳). علاوه بر این به مهارت شخص آزمون کننده نیز بستگی دارد. به دلیل خطاهای متعددی طی تشخیص کپک، نتایج آزمون یک نمونه در آزمایشگاه های مختلف متفاوت می‌باشد و نتایج حاصله قابلیت تکرار پذیری ندارند (۴). بنابراین تعیین یک روش استاندارد مبتنی بر روش های جدید مولکولی جهت تعیین دقیق میزان آلودگی کپکی این محصول لازم به نظر می‌رسد.

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 اختصاصی بودن 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 می‌گردد. مزیّت اصلی روش‌های مولکولی در شناسایی کپک ها نسبت به روش‌های غیر مولکولی این است که حتی یک سلول کپک نیز می‌تواند با این روش تشخیص داده شود، حال آنکه در نمونه های 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 روش های غیر مولکولی مرسوم شامل کشت روی محیطهای اختصاصی، ممکن است هفتهها به طول انجامد ولی ارزیابی به روشهای مولکولی میتواند در زمانی کمتر از یک ساعت انجام گیرد (۵).

در این پژوهش اسپور کپک *رایزوپوس اوریزا*[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 و همچنین میزان DNA کپک نیز با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد.

این تکنیک کاربردهای وسیعی در تشخیص بالینی و تحقیقات دارد. در این روش می‌توان یک توالی خاص را در DNA هدف گذاری، 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

[1] Howard Method Count

[2] *Rhizopus oryzae*

www.SID.ir

Archive of SID

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 با یک آنالیز در نقطه پایان[1] تشخیص داده می شود. اما در واکنش Real-time این اجازه داده می‌شود که محصول تکثیر شده در طول پیشرفت واکنش تشخیص داده شده و به طور هم زمان مقدار محصول هم اندازه‌گیری شود به همین دلیل Real-time نامیده می‌شود (۶ و ۷)

در واکنش Real-time PCR با استفاده از مولکول های فلورسنت افزایش مقدار DNA را با توسط 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 (۶ و ۷)

مهمترین مزیت Real-time PCR در مقایسه با PCR معمولی این است که Real-time PCR به ما این اجازه را می‌دهد که تعداد کپی الگوی اولیه را با صحت، دقت و حساسیت بالا تعیین کنیم. 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 DNA های موجود) مورد بررسی قرار گیرد. در این روش به این دلیل که واکنش‌ها در یک لوله انجام می‌شود (سیستم آزمایش بسته است) امکان آلودگی کاهش می‌یابد (۶ و ۷).

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 از گوجه فرنگی سالم، فاقد کپک، آفت زدگی و لهیدگی استفاده شد و رب گوجه فرنگی با ماده جامد محلول در آب ۲۴ تا ۲۶ مشابه رب‌های تجاری موجود در بازار تهیه شد. محصول بدست آمده در ظروف شیشه‌ای درب‌دار قابل اتوکلاو استریل شده پر کرده و بعد از درب بندی پاستوریزه شدند.

تهیه سوش کپک خالص

جنس کپک *رایزوپوس اوریزا* PTCC 5176 از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌ها به صورت خالص و لیوفیلیزه تهیه شد.

فعال‌سازی کپک و تهیه نمونه‌ها

برای فعال سازی کپک موردنظر از محیط کشت مالت اکسترکت براث[2] استفاده شد. فعال سازی آمپول لیوفیلیزه شده کپک تحت شرایط استریل و سترون شده طبق دستورالعمل سازنده انجام گردید. از سوسپانسیون کپکی تهیه شده در لوله بعد از گذشت چند ساعت اینکوباسیون در دمای ۲۵°C در محیط پوتیتو دکستروز آگار[3] به صورت خطی کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۲۵°C به مدت ۵ تا ۷ روز اینکوباسیون شدند تا کلنی‌های کپک ظاهر شده رشد کرده و میسیلیوم تولید کند (۸).

تلقیح کپک به رب گوجه فرنگی

بدین منظور با آنس استریل از اسپور کپک رشد کرده روی سطح محیط کشت برداشته و به وسیله محلول رینگر سوسپانسیون اسپور کپک تهیه شد. توسط لام هموسایتومتر تعداد اسپورهای کپک سوسپانسیون شده در داخل رینگر محاسبه شد (۱۰۸ تا ۱۰۹ عدد اسپور در هر میلی لیتر). سپس رقت‌های مختلف اسپور (10^1، 10^3 و 10^5) در هر گرم تهیه شده

[1] end-point
[2] Malt Extract Broth
[3] Potato Dextrose Agar

www.SID.ir

Archive of SID

و به رب اضافه شد و به مدت ۷۲h ساعت در ۲۵°C گرم‌خانه گذاری شدند تا اسپورها فرصت ایجاد فرم میسیلیومی را پیدا کنند و بتوان از نمونه های رب آلوده شده حاصله استخراج DNA را انجام داد.

استخراج DNA از میسیلیوم کپکی

در این تحقیق از روش بهینه شده السامرایی[1] و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد (۹). 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 ۲۶۰، ۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر و همچنین نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر، الکتروفورز بر روی ژل آگارز و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای پیش‌رونده و پس‌رونده (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 (*rhizopus oryzae*) پرایمرهای کاملا اختصاصی (species-specific) بر مبنای نواحی کاملاً محافظت شده[2] از هر گونه مورد نظر از ناحیهITS و 18srDNA 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، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۵). طراحی پرایمرها با استفاده از نرم افزارAllele ID انجام گرفت. توالی‌های پرایمرهای پیش‌رونده و پس‌رونده در جدول ۱ آورده شده است. سفارش سنتز پرایمرها با توالی های مذکور به شرکت بیونیر[5] کره جنوبی داده شد.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی دو پرایمر مورد استفاده در آزمون PCR

پرایمر	توالی نوکلئوتیدی پرایمرها '3→'5
پیش رونده	CCTGCTTCAGTATCATCACAAACC
پس رونده	ATCACACACATTTTAGGTGCTCAC

جدول ۲- برنامه زمانی (سیکل حرارتی) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

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

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

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش Real Time به منظور اندازه گیری 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[29] 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 گزارش گر (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 ثانیه افزایش داد (۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳). در پایان کار تمامی اطلاعات مربوط به تعداد کپی قالب های DNA، C_T و منحنی ذوب آن ها به دست آمد. با توجه به C_T مربوط به بیان هر قالب DNA و بازده آغاز گرها آنالیز داده‌ها صورت گرفت.

برنامه دما-زمان واکنش Real Time PCR به روش سایبرگرین در جدول ۳ آورده شده است.

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

مرحله	دما (°C)	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۱۰	۱
واسرشت سازی	۹۵	۱۵	۳۹
اتصال پرایمرها	۵۹	۲۰	۳۹
سنتز قطعه مورد نظر	۷۲	۱۵	۳۹

به منظور انجام Real-Time PCR از پرایمرهای پیش رونده و پس رونده برای کپک مورد استفاده که در جدول ۲ آورده شده است استفاده شد. برای انجام واکنش Real-Time PCR حجم نهایی هر محلول واکنش ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. برای دقت بیش تر و تسهیل کار حجم واکنش گرهای مورد نیاز هر پرایمر در تعداد میکروتیوب های آن ضرب گردید.برای سهولت در کار از مخلوط مادر سایبرگرین[30] ساخت شرکت پارس توس استفاده شد. پس از ساخت مستر میکس از این محلول به هر میکروتیوب به میزان لازم اضافه و سپس به تمامی میکروتیوب ها به جز نمونه کنترل منفی، ۲ µL از DNA مورد نظر اضافه گردید. مواد لازم برای واکنش عبارتند از: DNA دو میکرولیتر، پرایمر پیش‌رونده و پرایمر پس‌رونده با غلظت ۱۰ Pmol هر کدام یک میکرولیتر، مخلوط مادر سایبرگرین، ۱۰ میکرولیتر و آب مقطر ۶ میکرولیترکه به هر لوله اضافه می شوند. پس از اتمام این مرحله جهت حذف حباب‌ها، میکروتیوب‌ها اسپین و در دستگاه چیده شدند و سپس دستگاه آغاز به کار نمود.

نتایج

نتایج الکتروفورز ژل DNA

نتایج الکتروفورز ژل DNA بدست آمده در شکل ۱ نشان داده شده است. ارزیابی باندهای حاصل برای تمام جدایه‌های حاصل از این روش استخراج حاکی از وجود باندهای مشخص فاقد شکستگی و هاله در تمامی جدایه‌ها می باشد. نتایج الکتروفورز ژل نشان می‌دهد که استخراج DNA های مناسبی را جدا کرده است.

الکتروفورز ژل محصول PCR نمونه‌های DNA استخراج شده

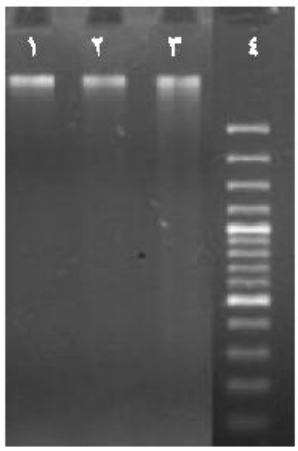
نتایج الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های حاصل از استخراج شکل ۲ نشان می‌دهد که تمامی جدایه‌های حاصل از این روش بر روی ژل باند ایجاد کرده‌اند به طوری که طول باند محصول PCR برای *رایزوپوس اوریزا* ۱۰۰bp بوده که بر روی

[29] Bio-Rad
[30] SYBR Green Real Time PCR Master Mix

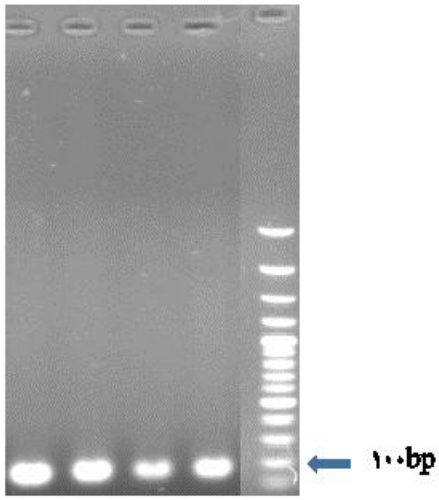
www.SID.ir

Archive of SID

ژل کاملا مشخص است که همه جدایه‌ها باند کاملا روشن و مشخص بر روی ژل ایجاد کرده‌اند. نتایج بیان کننده این مطلب است که ممانعت کننده‌های PCR را به طور کامل از محیط عمل خارج شده است.



شکل ۱- الکتروفورز ژل DNA استخراج شده کپک *رایزوپوس اوریزا* به ترتیب عبارتند از ۱- Rhizopus 10^1 ، ۲- Rhizopus 10^3 ، ۳- Rhizopus 10^5، ۴- Ladder (50 Kbp)



شکل۲- الکتروفورز ژل محصول PCR نمونه های DNA استخراج شده. به ترتیب عبارتند از ۱- Rhizopus ، ۲-Rhizopus 10^1، ۳- Rhizopus 10^3 ، ۴- Rhizopus 10^5 ، ۵- Ladder (50 Kbp)

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

به منظور اندازه‌گیری کمی میزان *رایزوپوس اوریزا* 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 *رایزوپوس اوریزا* استفاده شد.

از محلول DNA، رقت‌های پشت سر هم (10^{-1}-10^{-8}) تهیه گردید و مقادیر کمی از آن‌ها در واکنش Real-Time PCR با هر دو آغازگر 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 واکنش ها در دو تکرار انجام پذیرفت. غلظت‌های استاندارد بکار گرفته شده در آزمون Real Time PCR با استفاده از محصول PCR کلون شده و خالص شده کپک تهیه شد. به این منظور از DNA کلون شده رقت های متوالی با استفاده از آب دیونیزه تهیه شده و به عنوان غلظت‌های استاندارد در آزمون‌های Real Time PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

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

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- مقادیر C_T و مقادیر کمی DNA های استاندارد و مجهول مربوط به کپک *رایزوپوس اوریزا* حاصل از واکنش Real-Time PCR مطابق به روش سایبرگرین

نمونه	Ct±SD	مقدار DNA (ng)
استاندارد ۱	۱۴/۰۹ ± ۰/۱۱۳	$1\times10^{8}\pm$ ۰/۰
استاندارد ۲	۱۷/۵۵ ± ۰/۸۶۵	$1\times10^{7}\pm$ ۰/۰
استاندارد ۳	۲۰/۱۲ ± ۰/۰۲۵	$1\times10^{6}\pm$ ۰/۰
استاندارد۴	۲۳/۸۴ ± ۰/۱۹۱	$1\times10^{5}\pm$ ۰/۰
استاندارد ۵	۲۶/۶۴ ± ۱/۹۸۳	$1\times10^{3}\pm$ ۰/۰
نمونه ۱	۲۷/۵۱ ± ۰/۲۴۱	$1/06\times10^{3}\pm 2/3\times10^{2}$
نمونه ۲	۲۵/۳۷ ± ۱/۸۱۷	$1/29\times10^{4}\pm 1/50\times10^{4}$
نمونه ۳	۲۰/۱۸ ± ۰/۱۹۳	$8/12\times10^{5}\pm 1/41\times10^{5}$

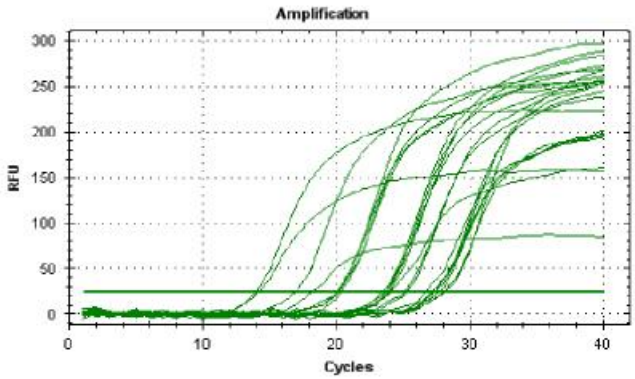
جدول ۵- استانداردهای ۱ تا ۵ DNA های کلون شده و رقیق شده با مقدار معلوم می باشد که شرح آن در قسمت قبل آورده شد.

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

همان طور که از نتایج جدول ۴ 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.

شکل ۳ روند تکثیر محصول Real-Time PCR نمونه‌های استاندارد و مجهول کپک *رایزوپوس اوریزا* را در هر سیکل نشان می‌دهد.

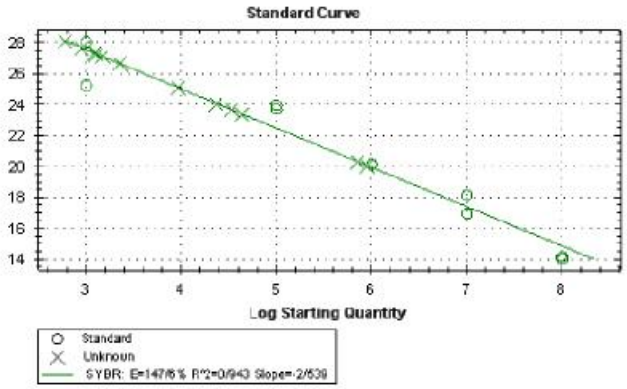
در شکل ۴ منحنی استاندارد که از رسم مقادیر C_T در مقابل لگاریتم غلظت هر یک از DNAهای رقیق شده از نمونه استاندارد مربوط به کپک آسپرژیلوس نایجر به‌دست آمده، مشاهده می‌شود. ضریب همبستگی خطی منحنی استاندارد (R^2=۰/۹۴۳) به‌دست آمد که نشان‌دهنده دقت تعیین کمّی بر پایه Real-Time PCR می‌باشد.



شکل ۳-روند تکثیر *رایزوپوس اوریزا* در هر سیکل آزمایش Real-Time PCR. محور عمودی: میزان فلورسانس ساطع شده، محور افقی: سیکل‌های واکنش

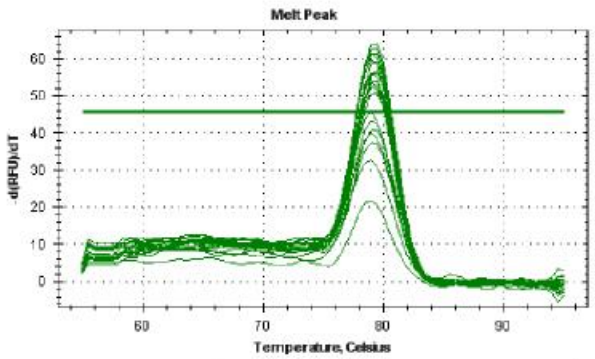
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- منحنی استاندارد *رایزوپوس اوریزا* 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 فرایند PCR انجام می‌شود. دمای ذوب DNA یک پارامتر ویژه برای این مولکول می‌باشد و به ساختمان DNA و عواملی نظیر طول و تعداد نوکلئوتید، میزان نمک محیط و درصد GC بستگی دارد. از آن‌جا که سایبرگرین نمی‌تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قائل شود، می‌توان با استفاده از منحنی ذوب تنوع محصولات را در فرایند PCR مشخص کرد.



شکل ۵- منحنی ذوب *رایزوپوس اوریزا* در آزمایش Real-Time PCR. محور عمودی: میزان فلورسانس ساطع شده، محور افقی: درجه حرارت بر حسب سانتی گراد.

بحث

نتایج الکتروفورز ژل DNA (شکل ۱) و ارزیابی باندهای حاصل برای تمام جدایه‌های حاصل از این روش استخراج نشان می‌دهد که روش استخراج DNA مناسب بوده است. وجود باندهای مشخص فاقد شکستگی و هاله در تمامی جدایه‌ها بیان کننده این مطلب می‌باشد.

نتایج الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های حاصل از استخراج (شکل ۲) بیان کننده این مطلب است که روش استخراج DNA توانسته است تمامی ممانعت کننده‌های PCR را به طور کامل از محیط عمل خارج کند.

همانطور که شکل ۵ مشاهده می‌شود نقطه اوج اضافی کوچکتر از پیک محصولات که نشانگر وجود پرایمر دایمر می‌باشد، موجود نبوده و این نشانگر آن است که پرایمرها تقابلی با هم نداشتند. 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 ۵ مشاهده می‌شود.

ساردیناس[31] و همکاران با استفاده از روش Real Time کمی با استفاده از سایبرگرین مقدار کپک‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* را در آرد گندم تعیین کردند. در این تحقیق از پرایمرهای ناحیه ITS ریبوزومی به عنوان هدف استفاده شد. حساسیت آزمون ۲/۵ پیکوگرم در هر واکنش برای هر دو گونه بود (۱۳).

[31] Sardinas

www.SID.ir

Archive of SID

کاستلا[32] و همکاران 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 جدایه های *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 پتانسیل آلودگی ماه غذایی به توکسین را پیشگویی و تعیین کرد. با استفاده از دو روش سایبرگرین و تک‌من [33]می‌توان گونه‌های *آسپرژیلوس نایجر* تولید کننده اکراتوکسین را شناسایی کرد (۱۲).

گیل سرنا[34] و همکاران مقادیر کمی کپک‌های *آسپرژیلوس اکراسوس* و *آسپرژیلوس وسترديجکیا* را در انگور و دانه های 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. کارایی آزمون ۹۴ درصد بود. مقادیر استاندارد برای منحنی استاندارد از طریق اضافه کردن مقادیر مشخصی اسپور کپک به انگور و دانه‌های قهوه بود که غلظت آن کاملاً مشخص بود. طراحی پرایمرها بر پایه ناحیه 5/8S1 و 5/8S2 از گونه‌های کپک‌های مورد نظر انجام شد (۱۴). ساردیناس، کاستلا و رودریگویز[35] 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 از سایبرگرین یک آزمون اندازه‌گیری کمی است که با افزایش میزان DNA کپک میزان نور فلورسنس افزایش می‌یابد این مطلب در نتایج بدست آمده در این تحقیق در جدول ۵ و همچنین شکل ۴ تایید شده است. نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد که با افزایش مقدار DNA در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های مجهول سیکل آستانه (C_t) مربوط به آن‌ها کاهش می‌یابد و این بدان معناست که با افزایش مقدار DNA شدت نور فلورسانس افزایش یافته و در سیکل‌های کمتری از PCR به فاز لگاریتمی می‌رسند. نتایج داده های این تحقیق با نتایج گیل سرنا و همکاران ساردیناس، کاستلا و رودریگویز همخوانی داشت.

همچنین با استفاده از منحنی نقطه ذوب DNA در شکل ۵ مشخص شد که DNA استخراج شده به طور کاملا اختصاصی تکثیر شده است و DNA اضافی و همچنین پرایمر دایمرها در جدایه‌های استخراج شده وجود نداشته است. محققین مذکور در تحقیقاتشان در خصوص اندازه‌گیری میزان کپک در مواد غذایی انتخاب شده به نتایج مشابهی دست یافتند.

کاستلا و همکاران 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، می توان پتانسیل آلودگی ماده غذایی به توکسین را پیشگویی و تعیین کرد. با استفاده از دو روش سایبرگرین و تک من می‌توان گونه های *آسپرژیلوس نایجر* تولید کننده اکراتوکسین را شناسایی کرد (۱۴).

رودریگویز و همکاران با استفاده از روش Real Time PCR، مقدار کمی کپک‌های تولید کننده اکراتوکسین A را در

[32] Castella
[33] Taq man
[34] Gil, serna
[35] Rodríguez

www.SID.ir

Archive of SID

مواد غذایی به دو روش سایبرگرین و پروب تک من اندازه-گیری کردند. اکراتوکسین A (OTA) مایکوتوکسین است که به وسیله کپک‌های مختلف که بیشتر از جنس پنی‌سیلیوم 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 تور فلورسنت و میزان کپک‌ها وجود دارد (۱۷).

نیکولایسن[۳۶] و همکاران 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 آورده‌اند (۱۸).

منابع

۱- الهامی راد اح، شهیدی ف.. ارزیابی تغییرهای فیزیکوشیمیایی و میکروبی رب گوجه فرنگی فله در طی نگهداری در سردخانه، علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی،۱۳۸۳، سال هشتم، شماره اول

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

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

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

5- Niessen L. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. International Journal of Food Microbiology. 2007, 119: 38–46.

6- Orlando C, Pinzani P, and Pazzagli M. Developments in quantitative PCR. Clinical Chemistry Laboratory Medicine. 1998, 36: 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: 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.

9- Al-samarrai, T.H and 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 NI. Multiplex PCR for The discrimination of A. fumigates, A. Flavus, A.nigar and A. terreus. Journal of microbiological methods. 2009, 76: 209-211.

11- Suanthie Y, Cousin MA, Woloshuk CP. 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 PCR for detection of the Aspergillus genus. *Journal of Environmental Monitoring*. 2007, 9: 599–609.

13- Gll serna J, Gonzales-salgado A, Gonzales- Jaen MT, 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, CabJ. Development of a real time PCR system for detection of Ochratoxin A-producing strains of the *Aspergillus Niger* aggregate. Food Control. 2011, 22(8):1367-1372

15- SardinasN, Vazquez C, Gill-serna J, Gonzalez-Jaen MT, 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 L G, Sartori D, Martinez A L, Vieira M L, Taniwaki M H, Fungaro M H. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selectiove amplification of β-tubulin

[۳۶] Nicolaisen

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Food Microbiology. 2011, 149(3): 226-235.

18- Nicolaisen M, Supronine S, Nielsen LK, Lazzaro I, Spliid NH, JustesenA F. Real-time PCR for quantification of eleven individual fusarium species in cereals. Journal of microbiological methods. 2009,

gene by using real-time PCR. International Journal of food microbiology. 2007, 119:270-276.

17- RodríguezA, Rodríguez M, Luque MI, Justesen AF, Córdoba J J. Quantification of ochratoxin A-producing molds in food products by SYBR Green and TaqMan real-time PCR- product .International

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of Real Time PCR measurement *rhizopus oryzae* in tomato paste

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

1- Food quality and safety research department, Food science and technology research institute, Mashhad. Iran

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

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

Abstract

In this study, Molecular method to measure the *rhizopus oryzae* Real Time PCR was used in tomato paste. Because of problems mold count HMC method such as Proofer error, low and non-repeatability precision, accuracy and repeatability developing a standard method that can enable high accuracy and repeatability and mold counts it seems necessary. Real Time PCR molecular methods can be used as a suitable method to identify and quantify the precise mold is considered that based on the measurement of absolute and relative genes is the existing molds. Tomato paste samples with different amounts of mold spores (10_1, 10^3 and 10^5) were contaminated per gram. After incubation and growth of mold spores and mycelium extraction DNA 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 *rhizopus oryzae* genus was determined. The results showed that increasing amount of DNA molds in controls and inoculated samples resulted Real Time curve in the lower C_T values are entered logarithmic phase. The correlation coefficient of linear calibration Real Time was $R^2 = 0/943$. This indicate 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.

Keywords: mold, quantification, SYBR green

* reza_karazhyan2002@yahoo.com

www.SID.ir