Archive of SID

استفاده از روش PCR-RFLP برای تعیین سویه‌های ژیاردیای جدا شده از انسان در ایران

میترا زارع بوانی M.S.P.H.☆♦، مصطفی رضائیان Ph.D.☆، محمود جدی تهرانی Ph.D.*، بهرام کاظمی Ph.D.*

☆ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه انگل‌شناسی و قارچ شناسی

* پژوهشکده ابن سینا، جهاد دانشگاهی، بخش ایمونولوژی

* دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۶۴۴۶-۱۴۱۵۵، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

چکیده

* **هدف:** ایزوله‌های مختلف ژیاردیای انسانی، که تحت عنوان ژیاردیا اینتستینالیس (Giardia intestinalis) می‌شناسیم، در حساسیت به دارو، الگوهای ایزو آنزیم، بیماریزایی و عفونت زایی، آنتی ژنها و الگوی برش آنزیمی متفاوتند. هدف از این بررسی، تعیین ایزوله‌های ژیاردیا با روش PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Lenght Polymorphism) است.

* **مواد و روشها:** در این بررسی بر روی DNA استخراج شده از تروفوزوئینهای به دست آمده از محیط کشت TYIS-33 تغییر داده شده با دو جفت پرایمر که بر اساس سکانس ژن آنزیم تریوزفسفات ایزومراز انگل ژیاردیا طراحی شده بودند واکنش PCR انجام گرفت. محصول PCR پرایمرها ۶۸۳bp و ۸۱۲bp بود که برای افتراق سویه‌ها از اختلاف برش آنزیمی آنها با آنزیم NcoI استفاده شد.

* **یافته‌ها:** الگوی RFLP ایزوله‌های ژیاردیا اینتستینالیس برای پرایمرهای I دو قطعه ۴۱۹bp و ۲۶۴bp و برای پرایمرهای II دو قطعه ۲۲۸bp و ۵۸۳bp می‌باشد. برای اطمینان از صحت باندهای فوق از مارکر DNA، ۱۰۰bp استفاده گردید.

* **نتیجه‌گیری:** با استفاده از روش PCR-RFLP می‌توان به طور اولیه، برخی از ایزوله‌های ژیاردیای جدا شده از انسان را تعیین نمود.

گل واژگان: RFLP، PCR، ژیاردیا، انسان، ایران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در نیمه اول قرن بیستم رده‌بندی ژیاردیا در سطح گونه مشکل و گیج کننده بود. گونه‌های مختلف با صحت مشکوک توضیح داده شده‌اند که اساساً توضیحات بیش از آنکه بر پایهٔ اختلافات مورفولوژیک باشند بر اساس میزبان انجام می‌شد. در سال ۱۹۵۲، Filice سه گونه ژیاردیا که از نظر مورفولوژی قابل تشخیص بودند پیشنهاد کرد. G.duodenalis (مترادف G.intestinalis، G.lamblia) گروه مشابه از نظر مورفولوژی که انسان و سایر پستانداران را آلوده می‌نماید، G.agilis (۱، ۲) در خزندگان و G.muris در جوندگان. اخیراً علاوه بر سه گونه معرفی شده توسط Filice، دو گونه جدید به نامهای G.psittaci و G.ardeae در پرندگان شناخته شده‌اند (۲).

ایزوله‌های G.duodenalis در تعدادی از مشخصات خارجی، رشد در *in vitro* حساسیت به دارو، ویرولانس، اختصاصی بودن میزبان (۱، ۳، ۴) الگوی ایزو آنزیمی، آنتی ژنها و الگوی آنزیمهای هضم کننده متفاوتند (۵). اهمیت بیولوژیک این اختلاف مشخص نیست (۶).

با مطالعات ایزوآنزیم و آنالیز DNA ثابت شده است که G.duodenalis هتروژن می‌باشد (۱). این ناهمگنی در رده‌بندی ژیاردیا اهمیت دارد. به علاوه ارتباط آشکاری بین تفاوت ژنتیکی و اختلاف در خصوصیات کلینیکی معلوم نشده است و تعیین خصوصیات ژنتیکی مقدمه‌ای برای مطالعات اپیدمیولوژیک یا پاتوفیزیولوژیک می‌باشد (۱). بیشتر مطالعات روی تنوع ژنتیکی ژیاردیا یا الگوی الکتروفورز ایزوآنزیمهای آن انجام شده است که قادر به مشخص کردن تعداد زیادی مارکرهای ژنتیکی است که نسبتاً ساده و ارزان می‌باشد. هر چند که توانقصی دارد و قادر به مشخص کردن جابجائی و جایگزینی نوکلئوتیدها نمی‌باشد (۱).

تعیین توالی مستقیم DNA (DNA Sequencing)، هیبریداسیون یا شکستن با آنزیمهای هضم کننده دارای حساسیت خوبی هستند و (RFLP) و هیبریداسیون DNA در مطالعات تاکسونومی و خصوصیات تک یاخته‌ها ارزش زیادی پیدا کرده است (۱).

آگاهی از ژیاردیازیس به عنوان بیماری مهم انسان سبب شده که مطالعات زیادی روی انگل عامل آن انجام شود. هر چند هنوز کمبودهای اساسی در دانش ما در مورد تمام جنبه‌های بیولوژیکی ارگانیسم و بیماری وجود دارد.

مواد و روشها

❋ کشت ژیاردیا

در این بررسی از نمونه مدفوع دفع کننده کیست به میزان مناسب (در هر میدان میکروسکوپی با بزرگنمائی X۴۰ حدود ۱۰-۱۵ عدد کیست) استفاده شد. پس از اطمینان از زنده بودن کیستها با استفاده از رنگ حیاتی ائوزین ۱ درصد، کیستها به روش گرادیان غلظت سوکروز تخلیص گردیدند. سپس کیستها به نسبت ۹:۱ با اسید کلریدریک 0.1N یک سی‌سی سوسپانسیون کیستی و نه سی‌سی اسید تیمار و پس از آن رسوب نهائی به محیط کشت TYIS-33 تغییر داده شده منتقل گردیدند. پس از باز شدن کیستها (Excystation) و رشد تروفوزوئیتها را سه بار با بافر PBS شستشو داده و رسوب نهائی در منهای ۷۲° سانتیگراد نگهداری شد (۷). تعداد ایزوله‌های مورد بررسی چهار مورد می‌باشد.

❋ استخراج DNA

حدود ۶-۱۰ میلیون تروفوزئیت ژیاردیا در ۲۰۰ میکرولیتر محلول STE (100mM NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA) سوسپانسیون شد و ۲ درصد SDS و ۴ میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه شد و ۳ ساعت در حرارت ۵۵° سانتیگراد قرار گرفت و پس از ۱۰ دقیقه جوشانیدن با روش فنل - کلروفرم تخلیص گردید (۸). DNA با الکل مطلق تغلیظ شد و با الکل ۷۰° نمکهای باقیمانده در DNA حذف گردیدند. رسوب نهایی در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. برای حذف RNA از RNAse استفاده شد.

❋ پرایمرها

از دو جفت پرایمر اختصاصی توالی ژن آنزیم تریوز فسفات ایزومراز (TPi) استفاده گردید (۴).

PFII- 5'- G C A G A A T G T G T A C C T A G A G G G G- 3'

PRII- 5'- T A G T C T C C T A G C T C C T T C T G G- 3'

PFI- 5'- A T G C C T G C T C G T C G C C C C T T C- 3'

PRI- 5'- C A C T G G C C A A G C T T C T C G C A G- 3'

آنزیم هضم کننده مناسب NcoI که اختلاف توالی در ژن مذکور را نشان می‌دهد توسط نرم‌افزار DNAsis انتخاب گردید.

واکنش PCR (1mM dNTP, 1.5mM $MgCl_2$, 20pmol primer, 1XPCR buffer, 2UTaq) در حجم ۲۵ میکرولیتر و با دستگاه ترمو سیکلر ساخت شرکت Eppendorf تحت شرایط ذیل انجام گرفت.

❋ شرایط PCR

(PCR) مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴° سانتیگراد انجام گرفت و سپس مراحل دناتوراسیون، آنیلینگ و extension هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه و ۳۰ مرتبه تکرار شدند. دمای آنیلینگ برای پرایمرهای (I) ۵۸° و برای پرایمرهای (II) ۶۰° و دمای مرحله extnsion ۷۲° سانتیگراد در نظر گرفته شد و نهایتاً واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت.

مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد و با دستگاه UV Transilluminator با طول موج 254nm مشاهده گردید.

❋ RFLP

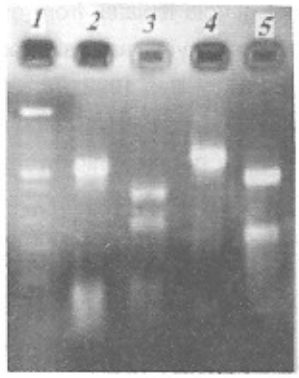
محصول PCR مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷° سانتیگراد با آنزیم NcoI هضم گردید. برای مشاهده قطعات حاصل از برش آنزیمی از ژل آگارز دو درصد استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

یافته‌ها

محصول PCR پرایمرهای I یک قطعه ۶۸۳bp است که آنزیم NcoI روی آن یک جایگاه دارد که پس از برش دو قطعه ۴۱۹bp و ۲۶۴bp تولید می‌کند. محصول PCR پرایمرهای II یک قطعه ۸۱۲bp است که پس از برش با آنزیم NcoI دو قطعه ۲۲۸bp و ۵۸۳bp ایجاد می‌کند. قطعات حاصل از برش آنزیمی محصول PCR روی ژل آگارز قابل افتراق می‌باشند. از این دو الگو برای تعیین سویه‌های ژیاردیا اینتستینالیس استفاده گردید. با این روش می‌توان سویه‌های ژیاردیا را به دو گروه RA و RB تقسیم نمود. گروه RA با هر دو پرایمر تکثیر می‌گردد ولی گروه RB فقط با پرایمر I تکثیر می‌گردد. چهار ایزوله مورد بررسی الگوی سویه RA را نشان دادند (شکل ۱).



شکل ۱: ستون ۱: DNA مارکر (۱۰۰bp Ladder)، ستون ۲: محصول PCR پرایمرهای PI، ستون ۳: تاثیر آنزیم NcoI بر روی محصول پرایمرهای PI، ستون ۴: محصول PCR پرایمرهای PII، ستون ۵: تاثیر آنزیمهای NcoI بر روی محصول پرایمرهای PII

در شکل شماره ۱ الگوی محصول PCR با پرایمرهای I و II قبل و پس از برش با آنزیم نشان داده شده است.

بحث

با روشهای مولکولی (RFLP و Sequencing) انگل ژیاردیا دئونالیس (ژیاردیا لامبلیا) به سه ژنوتیپ به نام گروههای ۱ (ایزوله WB)، ۲ (ایزوله JH) و ۳ (ایزوله GS) تقسیم می‌شود. بعضی نتایج محققین حاکی از آن است که گروههای ۱ و ۲ کاملاً مشابهند، در حالی که گروه ۳ کاملاً متفاوت از گروههای دیگر است. Homan و همکاران با استفاده از الکتروفورز ایزوآنزیمها و پروبهای DNA ایزوله‌های ژیاردیا را به (Polish) و (Belgian) تقسیم کردند (۹). Mayrhofer و همکاران بر اساس الکتروفورز ایزوآنزیمها ایزوله‌های ژیاردیا را به دو گروه اصلی A و B تفکیک نمودند و نشان داده‌اند که گروه A و B به ترتیب به گروههای (Belgian) و (Polish) که Homan و همکاران گزارش کرده‌اند مطابقت دارند (۱۰) و گروههای ژنتیکی I و II که Andrews و همکاران معرفی نموده‌اند رده‌هایی از گروه A هستند و گروه ژنتیکی I با گروه 1، Nash مطابقت دارد (۱۱).

PCR ایزوله‌های متعلق به دستجات اصلی (گروه I، II، III / IV) ژیاردیا اینتستینالیس که قبلاً توسط آنالیزهای آلوآنزیمی مشخص شده‌اند را تشخیص داده و دارای توان پتانسیل جهت طبقه بندی ژنتیکی ایزوله‌های ژیاردیا دئودنالیس به دست آمده از حیوانات می‌باشد (۱۲). در بررسی که توسط Meloni و همکاران بر روی ۴۷ ایزوله انجام گرفت با آنالیزهای ایزو آنزیمی و قطعات شکست، ۸ گروه ژنتیکی متفاوت به دست آمد که نتایج حاصله با یکدیگر همخوانی و ارتباط بسیار داشت که ارتباط بین این دو تکنیک نشان دهنده این می‌باشد که ژیاردیا دئودنالیس شامل کمپلکسی از کلونهای متفاوت ژنتیکی می‌باشد (۱). در بررسی دیگری که بر روی DNA ایزوله‌های با منشاء انسانی و حیوانی توسط آنالیز RFLP انجام گرفت، نیز تفاوت بین ایزوله‌ها نشان داده شد (۱۳).

در این بررسی از توالی ژن آنزیم تریوزفسفات ایزومراز (Tpi) استفاده شد و برش محصول PCR با آنزیم NcoI، ایزوله‌ها را به دو گروه RB، RA تقسیم نمودیم. با این روش ۴ ایزوله تروفوزوئیت ژیاردیا اینتستینالیس بررسی گردید که همگی دارای الگوی برش آنزیمی یکسان بودند (شکل ۱).

Gasser و همکاران دریافتند که در شرایط مشخص ایزوله‌های مختلف از میزبانان یکسان و متفاوت دارای رشد یکسان نمی‌باشند و اصلاً برخی ایزوله‌ها نمی‌توانند در محیط کشت مستقر می‌شوند (۱۴). مشخص شده است که تحت شرایط مطلوب *in vitro* ایزوله‌های مختلف ژیاردیا دارای نیازهای مختلف می‌باشند (۱۵).

References

1. Meloni BP, Lymbery AL,Thompson RCA: Characterizatian of Giardia Isolate using a non radiolabled and probe and correlation with the results of isoenzyme analysis. Am J Trop Med Hyg 1989; 4(6): 629-637

2.Thompson RCA, Hopkins RM, Homan WL: Nomenclature and genetic grouping Of Giardia infecting mammals. Parasitol Today 2000; 16(5): 210-213

3. McIntyre L, Hoarg L, Ong CS, Lee I: Renton Evaluation of molecular techniques to biotype Giardia duodenalis collected during an outbreak. J Parasitol 2000; 86(1): 172-177

4. Baurch AC, Renton JLI, Adam RD: The molecular epidemiology of Giardia lamblia; A sequence based approach. J Infect Dis 1996; 174(1): 233-236

5. Capon AG, Upcroft JA, Boreham PFL, Cottis LE, Bundesen PG: Similarities of Giardia antigens derived from human and animal sources. Int J Parasitol 1989; 19(1): 91-98

6. Bruno P, Meloni AJ, Lymbery and Thompson RCA: Isoenzyme electrophoresis of 30 Isolates of Giardia

www.SID.ir

Archive of SID

from humans and felines. Am J Trop Med Hyg 1988; 38(1): 65-73
7. Rezaian M, Ghalhari SM: Axenic culture and cryopreservation of Giardia lamblia isolated in Iran. J IR Iran 1995; 8(4): 255-258
8. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular coloning: A laboratory manual (2 ed) coldspring habor laboratory press, cold spring habor Ny, 1989, pp E.3-E-4
Comparsion of giardia isolates from different laboratories by iso enzyme analysis and recombinat DNA probes. Parasitol Res 1992; 78: 316-323
9. Homan WL, Van Enkevort FH, Limper L: Comparison of giardia isolates from different laboratories by iso enzyme analysis and recombinant DNA probes. Parasitol Res 1992; 78: 316-323
10. Maryhofer G, Andrews RH, Chilton NB: Division of giardia isolates from humans into two genetically distinct assemblages by electrophoretic analysis of enzymes encoded at 27 loci and comparison with giardia muris. Parasitogy 1995; 111: 11-17
11. Andrews RH, Adams M, Boreham PF, Maryhofer G, Meloni BP: Giardia intestinalis: electrophoretic evidence for a species complex. Int J Parasitol 1998; 19: 183-190
12. Olsen ME, Ceri H, Morck DW: Giardia vaccination. Parasitol Today 2000; 6(5): 213-217
13. Nash TE, Mc Cutchan T, Keister D, Dame JB, Gillin FD: Restriction endonuclease analysis of DNA from 15 Giardia isolates obtained from man and animals. J Infect Dis 1985; 152: 64-73
14. Gasser RB, Ekert j, and Roher L. infectivity of swiss giardia isoates of Jird and mice, and *in vitro* cultivation of trophozoites originating from seep. Paras Parasitology Res. 1978; 74: 103 111.
15. Binz N, Thompson RCA, Lymbery AJ, Hobbs RP: Compartive studies on the growth dynamics of two genetically distinct isolates of Giarbia duodenalis *in vitro*. Int J Parasitol 1992; 22(20): 195-202

www.SID.ir