

## تعیین الگوی پروتئینی و ایزوآنزیمی سروتیب‌های ۴a و ۴b *Listeria monocytogenes* به روش SDS-PAGE و MLEE

• عبدالرضا نبی‌نژاد

عضو هیأت علمی تحقیقات دامپزشکی اصفهان

• وحید نعمان

عضو هیأت علمی تحقیقات دامپزشکی اصفهان

• حبیب اله دادرس

عضو هیأت علمی دانشکده دامپزشکی شیراز

• سید محمدحسین حسینی

عضو هیأت علمی موسسه رازی، شعبه شیراز

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۶

Email: nabinejad@yahoo.com

### چکیده

در مطالعه حاضر دو سروتیب ۴a و ۴b *L. monocytogenes* جدا شده از شیر خام به روش SDS-PAGE و PAGE مورد شناسایی قرار گرفت در آزمایش SDS-PAGE پروفیل پروتئینی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از نشانگر مولکولی پروتئینی ارزیابی و معلوم شد که پروفیل پروتئینی دو سروتیب نزدیک به هم بوده ولی دارای تفاوت‌هایی در مناطق ۱۸ تا ۲۹ کیلو دالتون و منطقه ۶۸ کیلو دالتون بودند. بیشترین تراکم باندهای پروتئینی در منطقه ۱۴ تا ۹۷ کیلو دالتون بود. در آزمایش PAGE به منظور ارزیابی الکتروفور تیکی ایزوآنزیم‌ها (MLEE)، ۸ سیستم آنزیمی LDH، GLDH، G6PD، GaLDH، ۶PGDH، ME، GPI، AP مطالعه شد که در سروتیب ۴a تعداد ۱۵ ایزوآنزیم و در سروتیب ۴b تعداد ۱۳ ایزوآنزیم فعال بود. بر اساس نتایج بیشترین تفاوت در الکترومورفوسها در بین دو سروتیب در سیستم‌های آنزیمی ME، GaLDH، GLDH و ۶PGDH مشاهده شد بنابراین با استفاده از این ۴ سیستم در کنار سایر سیستم‌های آنزیمی می‌توان جدایه‌های مختلف را از هم تفریق نمود.

کلمات کلیدی: *Listeria monocytogenes*، پروتئین، ایزوآنزیم، MLEE، SDS-PAGE

Pajouhesh &amp; Sazandegi No 78 pp: 130-138

**Proteins and isoenzymes patterns evaluation in 4a and 4b serotypes of *Listeria monocytogenes* by SDS-PAGE and MLEE**

By: A.R. Nabinejad, Vet. Dept., Isfahan Research Centre of Agriculture and Natural Resources

V. Noaman, Vet. Dept., Isfahan Research Centre of Agriculture and Natural Resources

H. Dadras, Avian Medicine Dept., School of Vet. Med., Shiraz University

S.M. H. Hoseiny, Immunochemistry Dept., Razi Institute Branch of Fars

In current study 2 Isolated serotypes of *Listeria monocytogenes* included 4a and 4b were studied for protein profiles and Isoenzyme analysis using SDS-PAGE and MLEE. In SDS-PAGE the protein profiles of 2 serotypes mostly were the same to each other but in compersion to standard protein marker, there were much differences in 18 to 29 Kd and zone of 68 Kd. It was obviused that the most concentration of protein bands were distributed between zone of 14 to 97 Kd. In PAGE for MLEE, 8 enzymatic systems included AP, GPI, ME, 6PGDH, GaLDH, G6PD, GLDH, LDH were studied and in 4a serotype 15 isoenzymes and in 4b serotypes 13 isoenzyme were active; Based on the zymograms, it is concluded that the most differences between 2 serotypes were seen in GLDH, GaLDH, ME and 6PGDH systems, therefore using these enzymatic systems can differentiate *L. monocytogenes* isolates.

**Keywords:** *L. monocytogenes*, SDS-PAGE, MLEE, Protein, Isoenzyme

**مقدمه**

بیشترین (۹۰٪) عفونت‌های غذایی در انسان با منشا *L. monocytogenes* ناشی از سروتیپ‌های ۴a، ۴b، ۲a بوده است (۳، ۹). در سروتایپینگ *L. monocytogenes* با پادگن‌های تاژکی و پادتن‌های پیکری تاکنون ۱۶ سروتیپ در این گونه شناسایی شده است که مهمترین سروتیپ‌های بیماری زا عبارتند از ۴a، ۴b، ۲a، ۲c (۹). شناسایی بیماری در دام و انسان بر اساس سرولوژی و جداسازی عوامل و تعیین هویت عامل با استفاده از یکی از روش‌های سروتایپینگ، بیوتایپینگ، فاژتایپینگ و یا روش‌های مولکولار مانند بررسی پروفیل پروتئینی با SDS-PAGE<sup>۱</sup>، بررسی الگوهای ایزوآنزیمی (IEE=MLEE) یا بررسی ساختار اسیدهای هسته‌ای با RFLP، PCR، DNA-Probe و PFGE قابل انجام است. هر یک از روش‌های فوق الذکر بسته به سرعت، حساسیت و ویژگی، بودجه و امکانات مورد نیاز دارای نقاط ضعف و قوتی بوده و لازم است بر اساس شرایط و توقعات از یک یا چند روش استفاده نمود (۳، ۷، ۹، ۲۰).

MLEE از تکنیک‌های استاندارد شده مولکولی برای بررسی تنوع اپیدمیولوژیکی و مولکولار فیلوژنی باکتری‌ها و ارگانیزم‌ها بوده که بر اساس حرکت الکتروفورزی ایزوزیم‌ها در سطح ژل تفریق می‌گردند. این پروفیل‌های الکترومورفی برای مطالعه سیستم آنزیمی بکار رفته در واقع به طور غیر مستقیم ساختار ژنومی هر جدایه را نشان می‌دهد زیرا آنزیم‌ها دارای ماهیت پروتئینی بوده و بر اساس کدهای مربوطه در سطح ژنوم باکتری تولید شده و فعالیت می‌نمایند (۱۰، ۱۴، ۲۳، ۲۵)؛ در SDS-PAGE نیز پروفیل پروتئینی ارگانیزم در میدان الکتریکی و بر اساس وزن مولکولی از هم تفکیک می‌گردد (۱۰، ۲۸).

درسال‌های اخیر جدایه‌های بالینی و یا آلودگی‌های غذایی با منشا *L. monocytogenes* با استفاده از تکنیک MLEE مطالعه شده است، در طی ۱۵ سال گذشته روش MLEE در سطح وسیعی برای مطالعه ساختمان ژنتیکی و

لیستریاها از باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای شکل غیرهاگزا بدون کپسول، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، بیهوازی اختیاری و به قطر ۰/۴ تا ۰/۵ میکرومتر و به طول ۰/۵ تا ۲ میکرومتر با انتهای گرد می‌باشند. در سطح آگار مغذی کلنی دارای قطر ۰/۵ تا ۱/۵ میلیمتر بوده و به شکل گرد، شفاف و قطره اشکی با تحذب اندک با قوام نرم و لبه‌های تو رفته دیده می‌شوند. کلنی در تابش نور مستقیم ظاهر آبی خاکستری داشته و در نور مورب تالو آبی - سبز نشان می‌دهد. در سطح آگار خوندار نیز همولیز نوع بتا تولید می‌نماید باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH معادل ۶-۹ به خوبی رشد می‌نماید (۹، ۲۰، ۲۸).

مهمترین گونه لیستریا که در انسان و دام بیماری زا بوده گونه *L. monocytogenes* می‌باشد این باکتری سرما دوست بوده و در دمای یخچال به خوبی رشد می‌کند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا ۴ ماه می‌تواند غلظت ۲/۵ درصد نمک طعام را تحمل کند. لذا این باکتری به راحتی می‌تواند از طریق مواد غذایی به انسان منتقل شده و موجب مسمومیت‌های غذایی شود. مهمترین عوارض بیماری در انسان شامل سیتی سمی، عفونت سیستم عصبی مرکزی، عفونت‌های کانونی و عفونت‌های دستگاه تولید مثل می‌باشد (۸).

*L. monocytogenes* یک ساپروفیت با گسترده‌گی زیاد در طبیعت بوده و خاک مخزن اصلی آن می‌باشد این باکتری در بدن بسیاری از جانوران از جمله حیوانات اهلی و ماکیان وجود دارد و بوسیله آنها به انسان منتقل می‌شود لذا یک باکتری ژنومز هم می‌باشد. در ایران نیز در سال ۱۳۷۱ سروتیپ‌های ۴b، ۲b، ۴a، ۲c و ۲c از شیر و دیگر محصولات لبنی جدا شد. بیشترین درصد آلودگی ناشی از سروتیپ‌های ۴a و ۴b بوده است (۱). در مطالعه سرولوژیکی مادران با علائم سقط جنین نیز سروتیپ‌های ۲a، ۲b و ۴a جدا شده است. بر اساس گزارشات

در مطالعه حاضر از ژل پلی آکریل آمید به عنوان بستر الکتروفورز استفاده گردید. برای انجام SDS-PAGE از دترژنت سدیم دودسیل سولفات در ترکیب ژل، بافر سوبسترا و بافر الکتروفورز استفاده شد، لذا پروتئین‌ها فقط بر اساس وزن مولکولی خود در طول ژل حرکت نموده و سایر صفات پروتئین‌ها مانند بار الکتریکی و شکل فضایی در آن بی اثر می‌باشند به همین علت در SDS-PAGE هیچ فعالیت بیولوژیکی از پروتئین مورد انتظار نیست (۹، ۱۰، ۳۱).

پس از انجام کشت انبوه سروتیپ‌های ۴a و ۴b باکتری *L. monocytogenes* و تهیه شیرابه، مقدار پروتئین موجود در آن با استفاده از آزمایش لوری معادل ۱۰۰ mg/ml تعیین شد. نمونه‌ها برای انجام الکتروفورز بر روی ژل‌های ۷/۵٪، ۱۰٪ و ۱۲/۵٪ پلی آکریل آمید و با استفاده از نمونه‌هایی با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ µg تحت آزمایش قرار گرفت و در نهایت بهترین نتیجه آزمایش در ژل با غلظت ۱۰٪ و نمونه با غلظت ۲۵ µg حاصل شد (۷، ۸). در آزمایش SDS-PAGE مقدار ۵ µl از هر یک از نمونه‌ها را با مقدار مساوی بافر نمونه (واجد ۲ME) مخلوط نموده، برای مدت ۳-۵ دقیقه در آب جوش قرار داده تا دترژنت SDS سبب ایجاد شارژ منفی یکنواخت در پروتئین دنا توره شده و ۲ME نیز سبب شکستن باندهای S-S احتمالی در زنجیره گردد (۹، ۲۸) و چاهک ایجاد شده در ژل با نمونه نهایی پر (غلظت ۲۵ µg) و همچنین در حفره اول سمت چپ از نشانگر استاندارد پروتئینی-Gibco-Rpl-۲۰۰۲۰-۲۶۰۴۱ با وزن مولکولی ۱۴kd تا ۲۰۰kd استفاده شد. پس از پایان الکتروفورز (برای ۱۲ دقیقه در ۱۷ میلی آمپر و ۱۰۵ دقیقه در ۲۰ میلی آمپر جریان الکتریسته مستقیم برقرار شد)، ژل از ستون خارج شده و برای مدت ۳۰ دقیقه ژل را در داخل رنگ کوماسی و سپس برای مدت ۴۸ ساعت در اسید استیک ۱۰٪ قرار داده تا باندهای پروفیل پروتئینی مشخص شود (۸، ۲۸).

برای انجام PAGE در آزمایش MLEE، مقدار ۵ µl از هر یک از نمونه‌ها با مقدار مساوی بافر نمونه (که فاقد SDS و ۲ME است) مخلوط و بلافاصله در حفرات ژل قرار داده و جریان الکتریسته مشابه SDS-PAGE برقرار شد. در صورتیکه منظور از الکتروفورز انجام MLEE بود، پس از تهیه بافر حاوی سوبسترا، ژل را در داخل آن قرار داده و برای مدت ۴۵ دقیقه مجموعه را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری نموده، با توجه به وجود معرف‌های رنگزای PMS<sup>۵</sup> و NBT<sup>۵</sup> چنانچه واکنش سوبسترا و آنزیم تحت مطالعه مثبت باشد، در محل واکنش باند/باندهای به رنگ بنفش مایل به آبی رویت می‌شود (۲۳، ۲۷).

به طور خلاصه در جدول شماره ۱ سیستم‌های آنزیمی تحت مطالعه، سوبستراها، بافر، کوآنزیم و کوفاکتور مورد استفاده در آزمایش MLEE بر روی سروتیپ‌های ۴a و ۴b *L. monocytogenes* ارائه شده است به منظور کنترل فرایند آنزیمی، برای سیستم‌های آنزیمی G6PD و LDH از کنترل مثبت استفاده شد.

### نتایج و مشاهدات

در آزمایش SDS-PAGE بیشترین تراکم باندهای پروتئینی در منطقه ۹۷ کیلو دالتون تا ۱۴ کیلو دالتون مشاهده شد بر خلاف سروتیپ ۴b، در سروتیپ ۴a بین منطقه ۱۸ کیلو دالتون تا ۱۴ کیلو دالتون

تنوع اپیدمیولوژیکی باکتری‌های مختلف استفاده گردیده است، این تکنیک برای مطالعه و تفریق سویه و تحت تیپ‌ها در لاین‌های کشت سلولی جانوری و گیاهی، تک یاخته‌ها، باکتری‌ها، ریکتزیها، قارچ‌ها و میکوپلازماها مورد استفاده قرار گرفته و در مقایسه با سایر روش‌های مولکولی از دقت قابل قبولی برخوردار بوده و در سازمان بهداشت جهانی از روش‌های رفرانس به شمار می‌رود (۱۰، ۱۴، ۲۳، ۲۵، ۲۸).

در MLEE لازم است فعالیت بیولوژیکی پروتئین همچنان حفظ شود و تنها عملی که تحت شرایط کنترل شده اسیدیته و دمایی روی نمونه‌ها انجام می‌شود، PAGE<sup>۳</sup> یعنی الکتروفورز نمونه روی ژل پلی آکریل آمید است. در این عمل پروتئین‌ها به همان شکل موجود در سلول تحت تاثیر جریان الکتریسته مستقیم در داخل ژل بر اساس برآیند بار الکتریکی، وزن مولکولی و ساختمان فضایی از یکدیگر تفکیک می‌شوند، بنابر این فعالیت بیولوژیکی پروتئین‌ها (از جمله آنزیم‌ها) همچنان ادامه داشته و بر همین مبنا می‌توان ایزوآنزیم‌های مختلف یک آنزیم را از هم تفریق کرد. ایزوآنزیم‌ها در واقع آلوتیپ‌ها یا اشکال مختلف یک آنزیم بوده که همگی دارای وزن مولکولی و سوبسترای اختصاصی یکسان بوده، ولی در ساختمان فضایی و بار الکتریکی از همدیگر متفاوتند و از آنجا که آنزیم‌ها مانند دیگر پروتئین‌ها از طریق ژنوم کد دهی می‌شوند لذا تشکیل انواع مختلف یک ایزوآنزیم براساس تفاوت‌های ژنتیکی بسیار ظریف بوده و به همین دلیل با استفاده از این روش می‌توان گونه و سویه‌های مختلف یک ارگانیزم را از هم تفکیک نمود. در مطالعات انجام شده روی انواع مختلف ارگانیزم‌های تک سلولی و پر سلولی جانوری و گیاهی با استفاده از MLEE گونه‌ها، تحت گونه‌ها و سویه‌های مختلف با حساسیت بسیار زیاد و گاهی دقیق‌تر از سایر روش‌های مولکولی ژنتیکی از همدیگر تفریق شده‌اند (۳، ۷، ۱۰، ۲۸، ۳۰).

در مطالعه حاضر نیز دو جدایه *L. monocytogenes* جدا شده از مواد غذایی آلوده با سروتیپ ۴a و ۴b با استفاده از روش MLEE و نیز روش SDS-PAGE مورد شناسایی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها سویه‌های باکتری

دو سروتیپ از *L. monocytogenes* جدا شده از شیر و مواد لبنی شامل سروتیپ‌های ۴a و ۴b انتخاب و به طور جداگانه در مقدار یک لیتر محیط آبگوشت مغذی برای ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس توده سلولی را با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با قدرت ۱۰۰۰۰g برای مدت ۲۰ دقیقه ترسیب نموده، در ادامه پلت سلولی را با استفاده از سالیین نرمال استریل برای ۳ بار شستشو نموده و سپس با انجام سانتریفیوژ مجدد پلت سلولی را رسوب داده و با افزایش مقدار یک میلی لیتر آب مقطر استریل با استفاده از سونیکاتور مدل MSF Watt ۱۰۰ برای مدت ۹۰-۶۰ ثانیه، در طی ۹-۶ مرحله با قدرت ۶ تا ۹ میکرون در مجاورت پودر یخ پلت سلولی تخریب و سپس با سانتریفیوژ مجدد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۲۰۰۰۰g برای مدت ۱۰ دقیقه شیرابه باکتری را برای انجام آزمایش MLEE و SDS-PAGE در فریزر ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۷، ۲۱، ۲۸).

### انجام SDS-PAGE و MLEE



جدول ۲: به طور خلاصه نتایج آزمایش MLEE نشان داده شده است.

سیستم آنزیمی کیفیت	تعداد باند		صخامت باند		* حرکت الکتروفور تیکی باند		* تراکم باند	
	۴a	۴b	۴a	۴b	۴a	۴b	۴a	۴b
Enzymes in L. m								
LDH	۱	۱	۱	۱	۱/۷۵	۱/۷۵	M	M
GLDH	۲	۱	۱,۲	۱	۲/۷۵, ۶۷/۷۵	۱/۷۵	M,D	F
G۶PD	۲	۲	۱,۲	۱,۲/۵	۱/۷۵, ۷۳/۷۵	۱/۷۵, ۷۳/۷۵	M,VD	M,VD
GaLDH	۱	۲	۱	۱,۴	۱/۷۵	۱/۷۵, ۶۸/۷۵	D	D,M
۶PGDH	۲	۲	۱,۱	۱,۱	۱/۷۵, ۶/۷۵	۱/۷۵, ۳/۷۵	VD,F	VD,F
ME	۴	۲	۱,۲,۲,۱,۵	۱,۲	۱/۷۵, ۲/۷۵ ۴۹/۷۵, ۷۰/۷۵	۱/۷۵, ۴۵/۷۵	VD,F,VD,M	F,M
GPI	۲	۲	۱,۱,۵	۱,۱/۵	۱/۷۵, ۴/۷۵	۱/۷۵, ۴/۷۵	D,M	D,M
AP	۱	۱	۱	۱	۱/۷۵	۱/۷۵	VF	VF

\* تراکم باند: به شدت رنگ باند پس از انجام واکنش سوبسترا با آنزیم/ایزوآنزیم در حضور معرف‌های رنگ زای الکترون گیرنده گفته می‌شود، شدت رنگ از کم به زیاد به صورت بسیار کم رنگ (VF=Very faint)، کم رنگ (F=Faint)، متوسط (M=Moderate)، متراکم (D=Dens) و بسیار متراکم (VD=Very dens) تقسیم بندی شده است. حرکت الکتروفور تیکی باند: به طول حرکت باند یا الکترومورفس در ژل نسبت به کل طول ژل گفته می‌شود. در تمام موارد طول ژل ۷۵ میلی متر بوده است.

و اپیدمیولوژیکی گونه‌های باکتری‌ها استفاده شده است. و با توجه به اینکه در MLEE ژنوتیپ‌های مولتی لوکوس مورد استناد واقع می‌شوند در واقع ژنوم کروموزومی تمام جدایه‌ها بررسی می‌شوند. همچنین با استفاده از این روش ۴۵ الکتروتیپ، در ۱۷۵ جدایه *L. monocytogenes* مشخص شده است که در نهایت معلوم شد ۲/۳ موارد بیماری در انسان و دام ناشی از دو کلون مشابه و نزدیک به هم گونه *L. monocytogenes* بوده است ایشان قدرت تفریق MLEE را ۰/۹۲۵ تا ۰/۸۲۵ ارزیابی نموده و نشان دادند که حرکت آنزیم در ژل یا کیفیت الکترومورفسی آن تابع شرایط کشت باکتری تحت مطالعه نمی‌باشد (۱۰). با روش MLEE می‌توان رابطه آنتی ژنیکی بین گونه‌ها و سویه‌های مختلف را معرفی و طبقه‌بندی ارگانیزم‌ها را انجام داد (۱۰ و ۲۸).

مکانیزم‌های بیوشیمیایی متعددی تشکیل ایزوآنزیم‌ها را توجیه می‌کند، از آن جمله تغییرات پس از ترجمه، آنزیم‌های هترومولتی مریک، ژنهای چند ساختمانی با فعالیت مشابه، ایزوآنزیم‌های فضائی و تفاوت در واکنش و فعالیت کوفاکتورها هستند؛ به علاوه ممکن است یک آنزیم در شرایطی در یک باکتری فعال و در شرایطی دیگر غیرفعال باشد که دلایل اصلی آن عبارتست از تفاوت در تعداد ارگانیزم رشد کرده در آبگوشت، پایدار ماندن آنزیم در طی مراحل استخراج و میزان فعالیت آنزیم در شرایط تحت مطالعه می‌باشد (۱۷).

تاکنون مطالعات زیادی براساس آنالیز الکتروفورزی ایزوآنزیم‌ها یا مولتی لوکوس آنزیم الکتروفورز (MLEE) انجام پذیرفته است، این تکنیک را می‌توان با انتخاب سیستم‌های آنزیمی اختصاصی در ارگانیزم، در بافت آلوده شده با ارگانیزم تحت مطالعه انجام و ماهیت پاتوژن را مشخص کرد (۷، ۱۷). براساس بررسی منابع مطالعه الکتروفورزی ایزوآنزیم‌ها در

Pierre در SDS-PAGE بهترین نتایج بررسی *L. monocytogenes* را روی ژل ۱۰٪ به دست آوردند (۲۰). در مطالعه دیگری برای تعیین هویت عامل ایجاد عفونت منتقله توسط شیر پاستوریزه در کره جنوبی از ۵۰ نمونه شیر لیستریا مونوسییتو ژنز جدا شد که ۹۰٪ آلودگی‌ها توسط سرووارهای ۴a و ۲b به دست آمد (۳).

در آزمایش MLEE روی لیستریا مونوسییتوژنز، سیستم‌های LDH، GPI، PGI و G۶PD، ۶PGDH در مطالعات قبلی نیز استفاده شده بود (۱۰) ولی سیستم‌های آنزیمی AP، GaLDH، GLDH و ۶PGDH برای اولین بار در این مطالعه تحت بررسی قرار گرفت و فعالیت سیستم‌های آنزیمی در این تحقیق با مطالعات قبلی همخوانی داشت. همچنین در مطالعات قبلی بیشتر از ژل نشاسته یا سلولز یا ژل تیتان استفاده شده بود (۱۰) حال آنکه در این مطالعه ژل پلی آکریل آمید ۱۰٪ که دارای منافذ بسیار ریزتری می‌باشد بکار رفت. سیستم بافری TG نیز در مطالعات قبلی روی *L. monocytogenes* تجربه نشده بود. بر اساس نتایج با استفاده از آزمایش MLEE می‌توان سروتیپ‌ها و سویه‌های مختلف *L. monocytogenes* را (و نیز گونه‌های مختلف جنس لیستریا) را از هم تفریق نمود این تفریق با حساسیت و ویژگی بالایی بوده و کوچکترین تفاوت در ژنوم را معرفی می‌نماید. در مطالعه حاضر نیز تفریق دو جدایه (سروتیپ) ۴a و ۴b با این روش انجام گرفت (۱۰، ۲۳)

Dominique و همکاران از MLEE برای شناسایی انواع *L. monocytogenes* بیماری‌زا قابل انتقال توسط غذا از روش MLEE استفاده نمود. در این مطالعه ۸۰ سویه بررسی شد و با استفاده از ۸ تا ۲۳ سیستم آنزیمی تعداد ۱۴ تا ۱۵ الکترومورفس مشاهده شد. ایشان خاطر نشان نمودند که در ۱۵ سال گذشته برای مطالعات ساختمان ژنتیکی

نزد WHO به حساب می آید و به عنوان روش رفرنس معرفی می گردد (۷، ۱۴، ۱۷، ۲۴، ۲۷، ۲۸)، همچنین در مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی و تعیین منبع آلودگی در موارد زیادی روش MLEE، نتایج مشابه یا اختصاصی تر از سایر روش های مولکولی مانند PFGE، RAPD، PCR، RFLP، REA، ریبوتایپینگ، ایمنوبلات و انواع روش های سروتایپینگ، الیزا، فاژ تایپینگ داشته است (۷، ۸، ۱۷، ۱۸).

Schultz در سال ۱۹۸۹، با استفاده از IEE به راحتی تفاوت های بین انواع هیبریدهای *E. coli*، شیگلا و سالمونلا که برای واکنس سازی تهیه شده بود را با سرعت و ویژگی بالائی نشان داد و گزارش کرد که انواع باکتری پاتوژن را می توان از انواع غیر پاتوژن آن بصورت جدا گانه طبقه بندی نمود، وی استفاده از این روش را در شناسائی انواع کریپتوکوکوس، بوردتلا، سالمونلا، هموفیلوس و آمیب ها را اشاره می نماید (۲۴).

Yarkus و همکاران با استفاده از الکتروفورز ایزوآنزیم ها توانستند جدایه های مختلفی از *Mycobacterium avium* (عامل سل مرغی) را در افراد مبتلا به ایدز جداسازی کنند (۳۲).

Patton و همکاران ۱۰ روش از جمله MEE (IEE) را برای تشخیص اپیدمیولوژیکی سویه های کمپیلوباکتر استفاده کردند و در نهایت از میان REA، سروتایپینگ، سوترن بلات<sup>۱</sup>، ریبوتایپینگ، بیوتایپینگ، فاژتایپینگ، آنالیز پلاسمید حساسترین و بهترین نتایج مربوط به REA، MEE بود (۲۰).

Whitham و همکاران شباهت های بین سویه های مختلف *E. coli* عامل اسهال نوزادان را بوسیله آنالیز ایزوآنزیم ها و سرولوژی بررسی نمودند که در نتیجه بیشترین سویه را ۰۵۵:HV معرفی نمودند (۳۱).

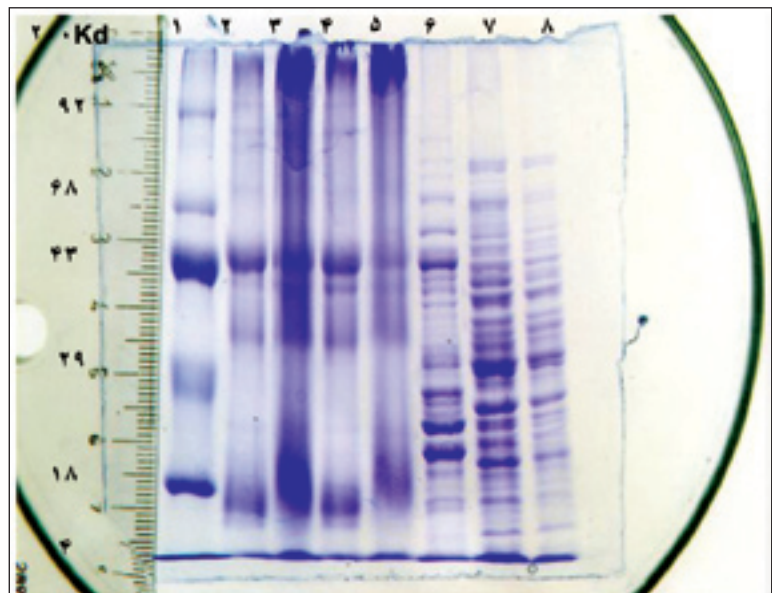
Schoeter و Helmuth انواع جدایه های *Salmonella enteritidis* را به روش های MLEE، RFLP، آنالیز پلاسمید و LPS و بررسی DNA مطالعه نمودند (۱۱).

Maslow و همکاران (۱۹۹۵) ۱۸۷ کلنی سویه های مختلف *E. coli* جدا شده از گردش خون بیماران را با روش های MLEE، ریبوتایپینگ بررسی و نتایج مشابهی در این دو روش به دست آوردند (۱۵).

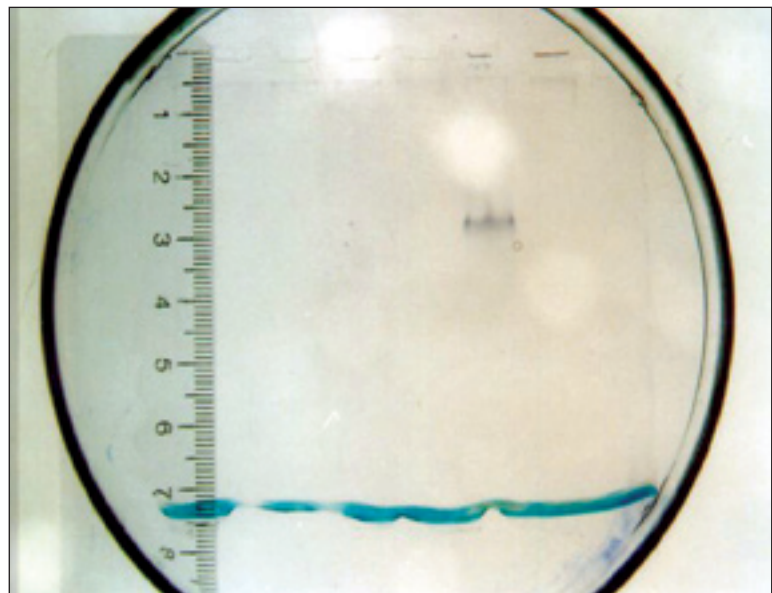
Pearce و همکاران در تفریق انواع *Prevotella nigrescense* بوسیله Rea، MLEE و ریبوتایپینگ بهترین نتیجه را از MLEE به دست آوردند (۱۹).

Murray و Tomayko جدایه های مختلف *Enterococcus faecalis* را توسط MLEE و PFGE تحت مطالعه قرار دادند که در نهایت MLEE تعداد جدایه های متنوع تری را نسبت به PFGE معرفی کرد (۲۹).

Leaves و همکاران با کمک MLEE مطالعه ژنتیکی و اپیدمیولوژیکی انواع *Haemophilus influenzae* را انجام



تصویر ۱: نتایج SDS-PAGE، در ستون اول نشانگر پروتئینی استاندارد Gibco از بالا به پایین به ترتیب مقادیر ۲۰، ۲۹، ۴۳، ۶۸، ۹۲، ۱۸ و ۱۴ کیلو دالتون را نشان می دهد. ستون های ۲ الی ۶ مربوط به این مقاله نبوده و ستون ۷ پروفیل پروتئینی سروتیپ ۴a و ستون ۸ پروفیل پروتئینی سروتیپ ۴b *L. monocytogenes* را نشان می دهد.



تصویر ۲: حرکت ایزوآنزیم ها در سیستم آنزیمی GPI با رنگ قرمز مایل به بنفش در ژل مشخص است

ابتدا روی مایکوپلازماها و آکلوپلازماها انجام پذیرفته است، پس از آنها، این روش برای مطالعه تفاوت های ژنتیکی، ژنتیک پلی مورفیسم و نیز تفریق بین گونه ای و داخل گونه ای (تیپ، تحت تیپ ها) و نیز وقوع تنوع اپیدمیولوژیکی در انواع باکتری ها، اسپیروکت ها، تک یاخته ها، قارچ ها، انگل های کرمی، کشت های سلولی و تیره های سلولی گیاهی و جانوری و حتی شناسائی واریته های مختلف گیاهی و حیوانات آزمایشگاهی استفاده شده است، این روش در حال حاضر از روش های معتبر در شناسائی تک یاخته ها و باکتری ها

PCR و MLEE جدا شده از طیور را به روش *hinotracheale* بررسی نمودند که هر دو روش ۶ سویه از باکتری را معرفی کردند (۲).

Lecointre و همکاران مولکولار فیلوژنی جدایه‌های *E. coli* را توسط روش‌های MLEE، PAPD، RNA RFLP r و مطالعه نمودند (۱۳).

Blackale و همکاران روش‌های MLEE و ریبوتایپینگ تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف *Pasteurella multocida* جدا شده از طیور را بررسی کردند و در هر دو روش نتایج مشابهی به دست آوردند (۶).

Sikorski و همکاران سویه‌های مختلف پزودموناز جدا شده از دریا، فاضلاب، خاک و نمونه‌های بالینی را بوسیله MLEE و PCR برای تعیین تفاوت‌های ژنوتیپی بین فنوتیپ‌های مختلف باکتری بررسی کردند (۲۲).

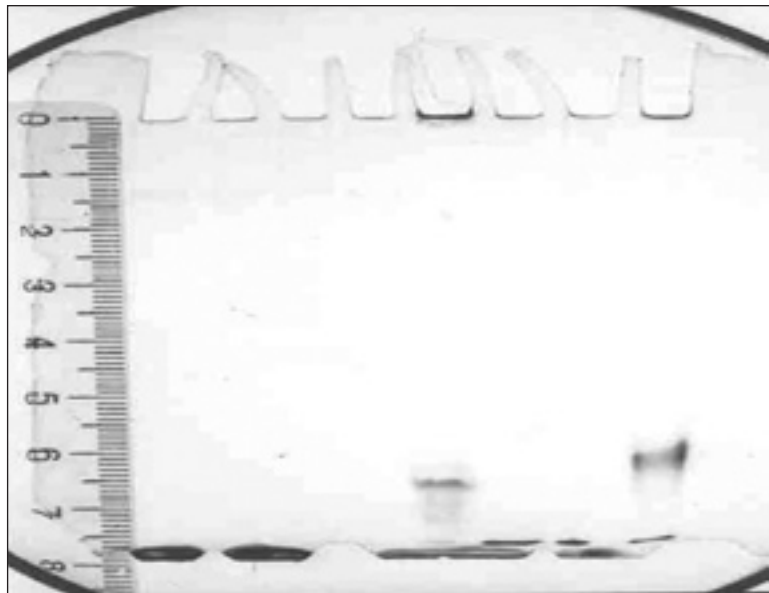
Beltran و همکاران تنوع ژنتیکی انواع جدایه *Vibrio cholerae* را بوسیله MLEE تحت مطالعه قرار دادند و ۲۷۹ تیپ الکتروفورتیکی تشخیص دادند که قابل تفکیک به دو گروه بزرگ I و II بودند (۴).

استفاده از MLEE برای شناسایی ژنتیکی قارچ‌ها نیز توسط Bertout و همکاران و Rodriguez و همکاران انجام پذیرفته است. این محققان به ترتیب مولکولار اپیدمیولوژی انواع *Cryptococcus neoformans* (۵) و *Aspergillus fumigatus* را مورد مطالعه قرار دادند (۲۲).

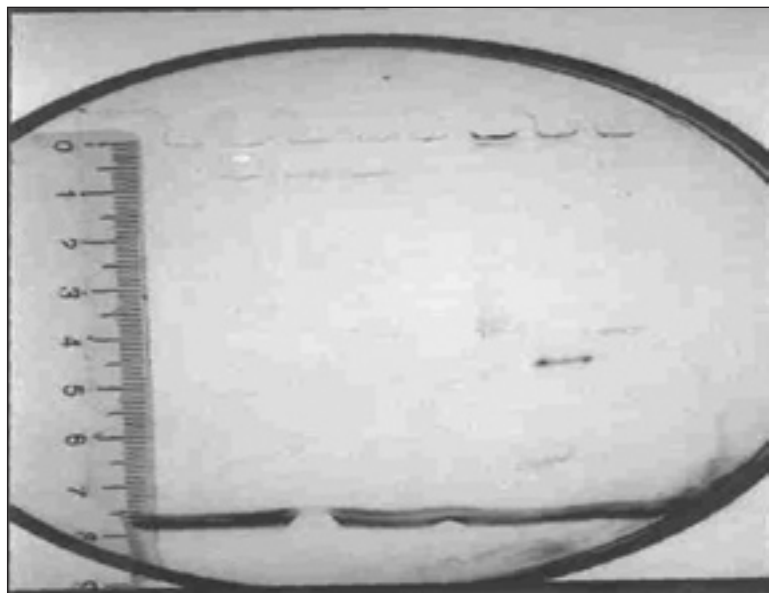
Shah و همکاران استفاده از روش MLEE را برای مطالعه پلی مورفیسم آنزیم‌ها در تنوع ژنتیکی باکتری‌های بی‌هوازی مطرح نموده‌اند و یادآوری نموده‌اند که فعالیت آنزیم در واقع مدت نحوه فعالیت متابولیکی و شاخص ژنوم باکتری است. لذا MLEE روش مناسبی برای تشخیص گونه، تحت گونه و سویه باکتری‌هاست و نحوه انجام MLEE و نمونه‌هایی از الکترومورفوس یا زیموگرام‌های به دست آمده از کار روی باکتریوایدس، پری وتلا، فوزباکتری و پپتواسترپتوکوکوس را نشان داده‌اند (۲۳).

Silveria و همکاران با استفاده از آنالیز ایزوآنزیم‌ها و ریبوتایپینگ انواع سویه‌های *E. coli* جدا شده از طیور با علائم تورم سر<sup>۱۱</sup> (SHS) و التهاب بند ناف و نیز پرندگان سالم را تحت مطالعه مولکولی قرار دادند و در نهایت مشخص شد که نتیجه MLEE در تشخیص انواع *E. coli* بهتر از r-RNA- RFLP می‌باشد و آنالیز ایزوآنزیم‌ها در جدایه‌های مختلف توانست تفاوت را بین آنها نشان دهد، همچنین از مقایسه نتایج MLEE در بین انواع *E. coli* پاتوژن و غیر پاتوژن (جدا شده از پرندگان سالم) معلوم شد که بین پیشینه ژنتیکی و اپیدمیولوژیکی باکتری و بیماری‌زایی آن رابطه مستقیم وجود دارد و لذا می‌توان حتی در یک سویه انواع پاتوژن را از انواع غیرپاتوژن جدا طبقه‌بندی نمود (۲۴، ۲۶).

Nabinejad و همکاران با استفاده از این روش مایکو



تصویر ۳: وضعیت ایزوآنزیم‌ها در سیستم آنزیمی G6PD را در تصویر برداری با ژل داکيومنتور نشان می‌دهد. ستون‌های ۱ تا ۵ مربوط به این مقاله نبوده و ستون‌های ۶، ۷ و ۸ به ترتیب مربوط سروتیپ ۴a و ۴b و *L. monocytogenes* کنترل مثبت می‌باشد



تصویر ۴: وضعیت ایزوآنزیم‌ها در سیستم آنزیمی ME را در تصویر برداری با ژل داکيومنتور نشان می‌دهد. ستون‌های ۱ تا ۵ مربوط به این مقاله نبوده و ستون‌های ۶ و ۷ به ترتیب مربوط سروتیپ ۴a و ۴b و *L. monocytogenes* می‌باشند.

دادند (۱۲).

Pupo و همکاران با کمک MLEE مشاهده نمودند که از نظر ژنتیکی اساساً انواع سویه‌های پاتوژن و غیرپاتوژن *E. coli* با همدیگر متفاوت بوده و در دو گروه مجزا قرار دارند (۲۱).

Amonsim و همکاران مطالعه مولکولار اپیدمیولوژی ۵۵ جدایه *Omithobacterium*

5- Bertout S. Renaud F. Swinne D. Mallie M. Bastide JM. 1999; Genetic multilocus studies of different strains of *Cryptococcus neoformans*: Taxonomy and gentic structure, J. Clin. Microbiol. 37 (3): 715-20.

6- Blackall, PJ; Fegan, N; Chew, GT. and Hampson, DJ. 1998; Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia. Microbiol. 144(pt2): 279-89.

7- Boerlin P.1997; Applications of mutiocus enzyme electrophoresis in medical microbiology J. Microbiol. Methods. 28 (3): 221-231.

8- Bollag D.M.,Edelstein S.J.1991; Protein methods, Wily-liss publication, Newyork,pp:150-197.

9-Cliver, D.O, 1990; Food borne disease, Academic press, INC., Harcourt Braco jovano vich,publishers;pp:248-256.

10-Dominque A.,C. Fraser E.,Ashton,. William F.B,mPatrick B.,William DS.,Christopher L.,Arthur G.,Joseph H.,Birig N., 1996; Mullti locus enzyme electrophoresis for characterization of *Listeria monocytogenes* isolates: Results of an international comparative study.;Internationmal Journal of Food Microbiology, 32,301-311.

11- Helmuth R. Schroeter A. 1994; Molecular typing methods for *S. enteritidis* Internation. LJ. Food Microbiol. 21 (1/2) 69-77.

12- Leaves N. Sisson PR. Freeman R. Jordens JZ. 1997; Pyrolysis mass spectrometry in epideniological and population genetic studies of *Haemophilus influenzae*. J. Med. Microbiol. 46(3): 204-207.

13- Lecointre G. Rachdi L. Darlu P. Denamur E. 1998; *Escherchia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. Mol. Biol. Evol. 15 (12): 1685-1695.

14- Leon AJ. Lee M. Ruferier CK. Berry ST. Mowers RP. 1997; Genetic mapping of a locus (hyp) affecting seed hypodermis color in sunflower (1997); Crop. Science. 36(6): 1666-1668.

15- Maslow JN. Whittam TS. Gilks CF. Wilson RA. Mulligan ME. Adams KS. Arbeit FD. 1995; Clonal relationships among blood stream isolates of *Escherchia coli*. Infect. Immun 63 (7) 2409-2417.

16- Nabinejad,A.R.,Dadras,H.,Hoseini S.M.S., 2003; Evaluation of isoenzyme patterns for identification of pathogenic poultry mycoplasmas, Iranian Journal of Veterinary Research(IJVR),No3, Serial 13,pp:31-39.

17-O'Brien, SJ; Simonson, JM; Grabowski, MW, Marino, W and Barile, MF, 1981; Analysis of multiple isoenzyme expression among twenty two species of Mycoplasma and Acholeplasma. J.bacteriol. 146: 222-232.

18-Patton, CM; Wachsmuth, IK; Evins GM; Kiehlbauch, JA; Plikaytis, BD; Troup, N; Tompkins, L and Lior H, 1991; Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic associated

پلاسماهای پاتوژن طيور را از هم تفريق و سويه‌های مختلف را شناسایی نمودند(۱۶).

مولتی لوکوس آنزیم الکتروفورز، روش مناسب و مقرون به صرفه ای برای پی بردن به ماهیت آنزیمی و ایزوآنزیمی باکتری‌ها و ارگانیزم‌های واجد انواع آنزیم دخیل در متابولیسم یا تکثیر و... می‌باشد(۱۶)، انتخاب نوع آنزیم بر اساس نوع متابولیسم ارگانیزم نقش و تاثیر زیادی در تفريق تحت تیپ‌ها داشته و حتی با این روش می‌توان اعضاء یک کلون از باکتری که فقط در شرایط نگهداری و نوع تغذیه از هم متفاوتند) به دلیل توسعه سیستم‌های آنزیمی مختلف برای استفاده از مواد مغذی و شرایط مختلف)، را از یکدیگر تفريق نمود که این پتانسیل را در دیگر تکنیکها کمتر می‌توان یافت، به هر حال تکنیک MLEE به دلیل دارا بودن بخش زیادی از محاسنی که لازمه یک تکنیک تشخیصی خوب است، نیاز به معرفی بیشتر دارد که هدف اصلی این مقاله و کارهای مشابه علاوه بر گزارش کاربردهای علمی و تحقیقی این تکنیک، معرفی و ترویج آن در قیاس با سایر روش‌های مطرح می‌باشد (۷، ۱۶، ۱۷، ۲۳) چنانکه مشاهده شد در این مطالعه نیز تفاوت‌های پروتئینی و ایزوآنزیمی در دو سروتیپ *L. monocytogenes* جدا شده از مواد لبنی آلوده به روش SDS-PAGE و MLEE (در کنار کنترل آنزیمی و نشانگر) معرفی گردید.

### پاورقی‌ها

- 1 -Sodium dodecyl sulfate poly acrylamid gel electrophoresis
- 2 -Isoenzyme electrophoresis=Multi locusenzyme electrophoresis
- 3 -Polyacrilamid gel electrophoresis
- 4- Phenazine methasulfate
- 5-Nitroblue tetrazolium
- 6-Posttranslational enzyme modification
- 7-Heteromultimeric enzymes
- 8 - Multiple structural genes for enzymes with the same activities
- 9 -Conformatinal isoenzyme
- 10-Southern blot
- 11- Swellen head syndrom

### منابع مورد استفاده

۱- وند یوسفی، ج.؛ مرادی بیدهنی، س، ۱۳۷۱؛ بررسی *L. monocytogenes* در شیر خام و پاستوریزه در ایران، پژوهش و سازندگی، شماره ۱۷؛ ص: ۶۵-۵۷.

2- Amonsin, A; Wellhan, JF; Li LL; Vanamme, P; Lindemn, C; Edmano, M; Robinson RA and Kapur, V, 1997; Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*; J. Clin. Microbiol. 35: 2894-98.

3- Ha,K-s,Park S-J,Seo SJ,Park J-H,Chung D-H., 2002; Incidence and polymerase chian reaction assay of *Listeria monocytogenes* from raw milk in Gyeognam province in Korea., Vol. 65, No. 1 PP: 111-118.

4- Beltron, P; Delgado, G; Navorro, A; Trujillo, F; Selander, RK. and Cravioto A; 1999; Genetic diversity and population structure of *Vibro cholerae*. J. Clin. Microbiol. 37(3): 581-90.



- campylobacter strains. J.Clin. Microbiol. 29(4): 680-88.
- 19- Pearce MA. Dixon RA. Gharbia SE. Shah HN. Devine DA. 1996; Characterization of *Preuoteza intermedia* and *prevotella nigrescens* by enzyme production, restriction endonuclease and ribosomal RNA gene restriction analysis. Oral. Microbiol Immunol. Vol. 11(3): p: 135-141.
- 20-Pierres Steffen, Dorothy A. S, Violaine D., Edith G., John A.C. And Pacale C. 2000; *Listeria monocytogenes* ActA protein interacts with phosphate *in vitro*. Cell motility and the cytoskeleton 45:58-66.
- 21- Pupo, GM; Karaolis, DK; Lan, R and Reeves, PR. 1997; Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. Infect. Immun. 65(7): 2685-92.
- 22- Rodriguez E. Symoens F. Mondon P. Mallie M. Piens MA. Lebeau B. Tortorano AM. Chalib F. Caylotti A. Villard J. Viviani M. Chapuis F. Nolard N. Grillot R. Bastide JM. 1999; Combination of three methods for the molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* infection. J. Med. Microbiol. 48, (2): 181-194.
- 23- Shah NH. Gharbia SE. Rajendram D. Ulger TN. 2000; Multilocus enzyme electrophoresis as a tool for studies of enzyme polymorphism and genetic diversity of anaerobic bacteria; Anaerobe (6) 117-19.
- 24- Schultz C. 1989; Isoenzyme analysis of typhoid shigella and escherchia- shigella hybrid vaccines and their parental strains, J. Clin. Microbiol. Dec. p: 2838-2841.
- 25- Sikorski, J; Rossell, MR and Lorenz, MG. 1999; Analysis of genotypic diversity and relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains by RCR- based genomic fingerprinting and multilocus enzyme electrophoresis. Systemic & Appl. Microbiol. 22(3): 393-402.
- 26- Silveria WD. Lanceloffi M. Ferreira A. Solferini VN. 2003; Determination of the clonal structure of avian *Escherchia coli* strains by isoenzyme and Ribotyping. Analysis, J. Vet. Med. B, 50 (2): 63-73.
- 27- Smith AA. Vanderbank HF. 2001; Isozyme and allozyme markers distinguishing two morphologically similar, medically important mastomys species (*Rodentia muridae*). BMC Genetics, 2:15,1-10.
- 28-Tabouret M., Rycke de J., and Dubray G. 2003; Analysis of surface proteins of listeria in relation to soecies, serovar and pathogenicity, Journal of General Microbiology, 138(4) 743-753.
- 29- Tomayko, JF and Murray BE; 1990; Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinent sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed field- gel electrophoresis. J.Clin.Microbiol. 33(11): 2903-7
- 30- Uphoff CC. Giganc SM. Drexler HG. 1992; Mycoplasma contamination in human leukema cell liness. Comparision of various detection methods. J. Immunol. Methods 149: 49-53.
- 31-Whittam TS. Wolfe ML. Wachsmuth LK. Orskovi, Wilson RA. 1993; Clonal relationships among *Escherchia coli* strains infantil diarrhea. Infect. Immun. 6(5): 1619-1629.
- 32-Yarkus, M., Reeves M. 1990; Characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates from AIDS patients by multilocus enzyme electrophoresis; Abst. Annu.meet. am. Soc. Microbiol., 13-17, 90-145.

