فصلنامه علمی پژوهشی

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۴، پاییز ۱۳۸۸

انگشت نگاری ژنومی مایکوباکتریوم بویس سویه AN5 توسط تکنیک RFLP

مرجان حیدرزاده *[۱]، میترا صالحی[۱]، رضا عارف پژوهی[۲]، مهدی بلفیون[۱]، کیومرث سلیمانی[۲] و نادر مصوری[۲]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ۲. موسسه واکسن سازی وسرم سازی رازی کرج

چکیده

یکی از مهم ترین استراتژی های قابل قبول و رایج در سراسر جهان برای کنترل سل گاوی، شناسایی گاوهای آلوده با تست توبرکولین و کشتار موارد مثبت است. برای تهیه توبرکولین نیاز به توده انبوهی از مایکوباکتریوم بویس سویهAN5 می باشد که با کشت بذر باکتری فراهم می شود. بدلیل کشت های متوالی اجباری در تهیه این فرآورده می بایستی پایداری ژنتیکی سویه مورد استفاده در نسل های متفاوت مورد ارزیابی قرار گرفته تا از عدم تغییرات ژنتیکی آن اطمینان حاصل شود. بر این اساس تحقیق حاضر برای بررسی تغییرات ژنومی سویه AN5 در طی کشت های متوالی صورت پذیرفت. ابتدا برای اثبات مایکوباکتریوم بویس بودن سویه مورد نظر در این تحقیق یک قطعه از شبه ژن oxy R به طول ۵۴۸ جفت باز هدف آزمایش PCR_RFLP قرار گرفت. نوکلئوتید ۲۸۵ از قطعه هدف مذکور در ژنوم مایکوباکتریوم بویس، حاوی بازآدنین، در حالیکه در تمامی دیگر اعضاء کمپلکس توبرکلوزیس حاوی باز گوانین می باشد که باعث از بین رفتن یک سایت عملکرد آنزیم AluI می شود. لذا در قطعه مذکور، در مایکوباکتریوم بویس چهار سایت برش، در حالی که در سایر مایکوباکتری های کمپلکس، سه سایت برش توسط این آنزیم وجود دارد. در سویه مورد بررسی در این تحقیق، قطعه مورد نظر از شبه ژن oxy R توسط PCR تکثیر و سپس با استفاده از آنزیم AluI برش داده شد و الگو برش مورد بررسی قرار گرفت. سپس پنج نسل متوالی از این سویه بر روی محیط کشت لونشتاین جانسون کشت داده شدند. از کلنی های مشخص طبق روش ون_سولینگن، DNA های لازم استحصال شده و این DNAها توسط آنزیم های محدود کننده AluI وPvuII هضم و الگوهای به دست آمده با روش RFLP پس از هیبریداسیون با پروب های DR و PGRS با یکدیگر مقایسه شدند. در بررسی نتایج حاصل از هضم آنزیمی توسط آنزیم های Pvu II و Alu I و هیبریداسیون با پروب های DRوPGRS تعداد باندها و وزن ملکولی آنها در تمامی نسل های مورد بررسی یکسان بودند و هیچ گونه تفاوتی مشاهده نشد. به نظر می رسد یکسان بودن سایز ملکولی و تعداد باندهای الگوهای به دست آمده توسط تکنیک DR, PGRS_RFLP، بیانگر عدم تغیرات ژنومی حداقل در ۵ نسل اول کشت شده این سویه در محیط لوونشتاین جانسون است.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم بویس سویه AN5، سل گاوی، توبرکولین،RFLP، هیبریداسیون با پروب های DR و PGRS.

مقدمه

سل گاوی از مهم ترین بیماری های خانواده بویده به ویژه گاوها در سراسر دنیا از جمله ایران به شمار می آید(۱). عامل بیماری، مایکوباکتریوم بویس از اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده که برخلاف سایر اعضای این کمپلکس که میزبان تقریبا اختصاصی

Archive of SID

www.SID.ir

دارند، دارای میزبان های متعددی از جمله انسان می باشد(۲).

سل دامی از نظر میزان اشاعه، اهمیت اقتصادی و بهداشتی، یکی از اصلی ترین انواع بیماریهای دام، محسوب می شود.

در ایران از سال ۱۳۳۷ برنامه ریشه کنی سل گاوی آغاز شده، با این وجود هنوز بیماری در سراسر دنیا از جمله ایران، کم و بیش وجود دارد به طوری که هر ساله مبلغ قابل توجهی برای ادامه برنامه ریشه کنی به آن اختصاص داده می شود(۳).

شناسایی دقیق سویه ها توسط تکنیک های استاندارد ملکولی، برای تعیین سویه های شایع و تمایز بین آنها مفید است. امروزه از مطالعات اپیدمیولوژی سل در ارزیابی برنامه های کنترل بیماری، تعیین بروز، میزان شیوع و از ژنوتایپینگ ایزوله ها و مولکولار اپیدمیولوژی در قرابت و طبقه بندی سویه ها، ارتباط بین سل حیوانات مختلف وسایر فاکتورهای دخیل در آن و همچنین رد یابی منشاء عفونت استفاده های شایانی می نمایند. استفاده از تکنیک انگشت نگاری DNA، ابزاری دقیق در مطالعه جدایه های مایکو باکتریوم جهت مشخص کردن منشاء عفونت و جلوگیری از انتشار آن مطرح شده است. در این روش مولکولی می توان به پروفایل انگشت نگاری مانند RFLP اشاره کرد. اساس RFLP مبنی بر وجود پلی مورفیسم قطعات حاصل از برش در طول ژنوم می باشد. تعداد و موقعیت این باند ها درکل ژنوم مایکوباکتریوم منجر به تشکیل الگوی انگشت نگاری ژنتیکی می شود که برای تفکیک و افتراق سویه ها مورد استفاده قرار می گیرد (۴).

اساس استراتژی کنترل سل گاوی بر پایه تست های منظم گاوها با توبرکولین است. توبرکولین آنتی ژن های پروتئینی باسیل توبرکول است که از تخلیص پروتئین های کشت های خالص کشته شده مایکوباکتریوم ها تهیه می‌شود. امروزه برای تهیه توبرکولین گاوی از مایکوباکتریوم بویس سویه AN5 استفاده می شود. این سویه برای اولین بار در سال ۱۹۴۸ میلادی در کشور بریتانیا جداسازی شد و از سال ۱۹۷۵ میلادی تاکنون در سراسر دنیا برای تولید توبرکولین گاوی استفاده می شود(۵). در ایران در موسسه سرم سازی و واکسن سازی رازی که تنها تولید کننده انحصاری توبرکولین گاوی در ایران از سال ۱۹۶۰ میلادی تاکنون است، از سال ۲۰۰۴ از این سویه برای تولید توبرکولین گاوی استفاده می شود.

تا کنون مطالعات ژنومی محدودی در مورد این سویه گزارش شده است (۶). به همین دلیل همواره نگرانی جهت تغییرات ژنومی آن، با توجه به رشد بسیار کند آن بر روی محیط کشت و طولانی بودن زمان انکوباسیون وجود داشته است. این تحقیق در راستای تهیه الگوهای ژنومی ۵ نسل متوالی از این سویه در شرایط آزمایشگاهی و مقایسه آنها جهت اطمینان از عدم تغییرات ژنومی با روش ملکولی RFLP و هیبریداسیون با پروب های نشاندار شده انجام شد.

پروب ها قطعه ای از ملکول های تک رشته ای DNA یا RNA هستند که به روشهای مختلف نشان دار (لیبل) می شوند. این پروب ها با توالی نوکلئوتیدی مکمل خود با DNA ی هدف، در شرایط ویژه آزمایشگاهی هیبرید می شوند سپس نواحی هیبرید شده به طرق مختلف ردیابی شده تا تفاوت سویه‌ها به لحاظ جایگزینی پروب در نواحی خاص کروموزوم نمایان گردند. به طور کلی پروب‌ها به ۳ دسته بزرگ تقسیم می گردند که عبارتند از:

۱- اولیگو پروب ها (مانند PGRS و DR).

۲- PCR پروب ها (مانند IS6110 و IS901).

۳- RNA پروب ها (۷).

در این تحقیق از پروب های DR&PGRS نشاندار شده استفاده شد.

مواد و روش ها

ابتدا از سویه مورد نظر (*Mycobacterium Bovis* strain AN5_ATCC no. 35726,TMC 412)، در محیط لونشتین جانسون کشت داده شد سپس طبق روش ون-سولینگن استخراج DNA به عمل آمد پس از ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، PCR یک منطقه ژنومی از کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*oxyR*) انجام شد، ردیف پرایمرهای مناسب پیشرو و معکوس جهت PCR یک قطعه ۵۴۸ جفت بازی از ژن مذکور، به شرح زیر می باشد:

Forward Primer *OXYR:*
S'- GGT GAT ATA TCA CAC CAT A-3'
Reverse Primer *OXYR*:
S' – CTA TGC GAT CAG GCG TTG- 3'

طبق پروتوکل موجود از پرایمرهای فوق توسط آب مقطر

Archive of SID

www.SID.ir

محلول استوک آماده گردید و جهت نگهداری مناسب در ۴ لوله میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتر استریل تقسیم گردید و در C ° ۲۰ نگهداری می شود. در این مرحله از پرمیکس های آماده تجارتی که حاوی DNA پلیمراز، dNTP، بافر PCR حاوی $MgCl_2$ و KCl و لودینگ بافر می باشد استفاده گردید. به این ترتیب که جهت هر نمونه مورد آزمایش یک تیوب از پرمیکس در نظر گرفته شد و پس از افزودن ۱۵۰ - ۱۰۰ نانوگرم از هر DNA استخراج شده و ۲ میکرولیتر از پرایمرهای پیشرو و معکوس، از هر پرایمر یک میکرولیتر اضافه گردید و سپس حجم نهایی توسط آب مقطر استریل به μL ۵۰ رسانیده شد. میکروتیوب ها پس از افزودن آب مقطر و DNA در یخ قرار داده شدند سپس میکروتیوب ها برای مدت یک دقیقه داخل دستگاه ترمومیکسر (با off نمودن درجه حرارت) قرار داده شدند تا یک محلول یکنواخت و همگن ایجاد شد و پس از این مرحله توسط دستگاه ترموسایکلر PCR از قطعه ۵۴۸ جفت بازی *oxyR* بر طبق برنامه دما و زمان موجود در جدول(۱) انجام گرفت.

جدول۱. برنامه دما ، زمان و چرخه ترمو سایکلر

مراحل PCR	دما	زمان	تعدادسیکل
دناتوراسیون اولیه	۹۴د رجه سانتیگراد	۱دقیقه	یک سیکل
دناتوراسیون	۹۴د رجه سانتیگراد	۲۱ثانیه	۳۰ سیکل
آنیلینگ	۵۵ درجه سانتیگراد	۲۱ثانیه	
بسط زنجیر	۷۲ درجه سانتیگراد	۲۲ثانیه	
بسط نهایی	۹۴د رجه سانتیگراد	۵دقیقه	یک سیکل

برای کنترل مثبت از DNA استخراج شده BCG. $P_2$۱۱۷۳ استفاده گردیده کنترل منفی حاوی تمامی اجزاء میکروتیوب کنترل مثبت و فاقد DNA، الگو بود و به جای DNA آب مقطر اضافه می شود. محصول PCR الکتروفوزگردید و مشاهده باز ۵۴۸ جفت بازی نشان داد که DNA استخراج شده به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تعلق دارد.

سپس هضم آنزیمی DNA (RFLP)، توسط آنزیم *Alu I* و الکتروفورز قطعات برش خورده انجام شد.

آنزیم محدود کننده آندونوکلئاز توالی های کوتاه DNA را شناسایی نموده و در مکانهای خاصی داخل و یا در مجاورت سکانس شناسی شده DNA دو رشته ای برش ایجاد می نماید. این برش موجب شکل گیری گسستگی در قطعات DNA می گردد. آنزیم *AluI* در سکانس های $\frac{AG}{CT}$ $\frac{TC}{GA}$ برش ایجاد می نماید. مراحل کار به ترتیب زیر انجام گرفت.

برای هر نمونه مورد آزمایش یک میکروتیوب استریل یک میلی لیتری انتخاب و شماره نمونه مورد نظر بر روی میکروتیوب درج گردید برای انجام هر واکنش RFLP مواد مورد نیاز به شرح زیر با یکدیگر مخلوط شدند. آنزیم *AluI* (۱۵ u /۲ L) ۲/۵ میکرو لیتر (به ازای هر ۲۰۰۰ میکروگرم DNA یک میکروگرم بافر RFLP* ۱۵ ، ۴ میکرولیتر (۰/۱ حجم نهایی) DNA برداشت شده از محصول PCR (براساس وجود ۵۰۰۰ میکروگرم در هر میکرولیتر) بعد از انجام نانودراپ محاسبه و به میکروتیوب مورد نظر افزوده گردید و نهایتاً توسط آب مقطر استریل حجم نهایی بر ۴۰ میکرولیتر رسانیده شد. مواد فوق به مدت۵ ثانیه در یک میکروسانتریفیوژ در دور g۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ و حداقل به مدت ۹۰دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد (ترجیحاً یک شب بهتر است و در این تحقیق به مدت یک شب در بن ماری C ° ۳۷ قرار گرفت) و انکوبه گردید.

پس از جدا سازی قطعات DNA به وسیله الکتروفورز از ژل مورد نظر توسط دستگاه ژل داک عکس تهیه گردید که با تائید مایکوباکتریوم بویس بودن نمونه مورد بررسی ادامه تحقیق به صورت زیر انجام شد:

تکثیرنسل‌های متوالی‌مایکوباکتریوم بویس سویه AN5 در محیط های کشت شیب دار لوونشتاین جانسون حاوی پیروات و دمای C ° ۳۷ انجام شد. برای این منظور نسل اول این سویه از کشت نمونه لیوفیلیزه تهیه شده از کشور ترکیه، آماده شد. در هر نسل بعد از گذشت ۴ الی ۶ هفته از زمان کشت، بررسی های لازم جهت اطمینان از رشد مناسب کلنی ها انجام شد. برای تهیه نسل بعدی ابتدا مقداری از کلنی ها در شرایط کاملا سترون به محیط های کشت جدید منتقل و سپس کلنی ها باقی مانده، جهت استخراج DNA جمع آوری شدند. استحصال DNA از مایکو باکتریوم های ۵ نسل، طبق روش ون- سولینگن (Van Soolingen) انجام گرفت (۸). DNA های استخراج شده، توسط دستگاه ژل الکتروفورز ارزیابی کیفی و توسط دستگاه نانودراپ ارزیابی کمی شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

برای هضم آنزیمی از DNA های کامل و شکسته نشده با غلظت ۷۰۰ الی ۱۴۰۰ نانوگرم بر ماکرولیتر استفاده شد. در حدود ۳ میکروگرم از نمونه‌های DNA، با استفاده از *Pvu II* یا *Alu I* شرکت رش آلمان(در مراحل جداگانه) در یک ماکروتیوب (اپندورف) به حجم نهائی ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد.

جدول۲. میزان مواد مورد استفاده جهت برش DNA کروموزومی با آنزیم‌های محدود کننده

مواد مورد نیاز	میزان
x M buffer۱۰	۲ میکرولیتر
آنزیم *Pvu II*	۲ میکرولیتر
DNA (3 µg)	X µl میکرولیتر
آب مقطر استریل	Y µl میکرولیتر
حجم نهایی	۲۰

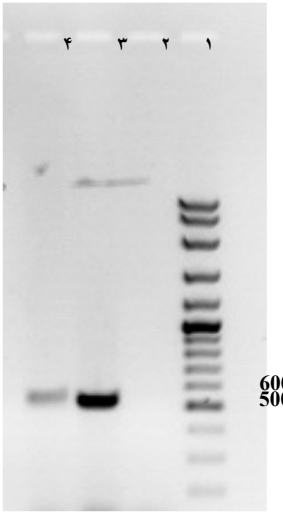
در فرمول بالا X بیانگر میزان حجمی DNA استفاده شده و Y بیانگر میزان آب مقطر مورد استفاده می باشد.

سپس نمونه ها برای انجام هضم مطلوب در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انکوبه شدند. محصول حاصل از برش آنزیم، در دستگاه ژل الکتروفورز در ولتاژ ۴۰ ولت به مدت یک شب قرار گرفت(RFLP). قطعات برش خورده در طول ژل آگارز، بر اساس وزن ملکولی از یکدیگر تفکیک شدند. پس از الکتروفورز، ژل آگارز در محلول اتیدبروماید رنگ آمیزی و برای مشاهد باند های رنگ شده در دستگاه ژل داک قرار گرفت. سپس ژل آگارز با بافرهای دناتوره کننده، دپورینه کننده و نوترالیزه کننده عمل آوری شد و ساترن بلاتینگ برای انتقال DNA با بار منفی به غشاء نایلونی دارای مثبت صورت گرفت.

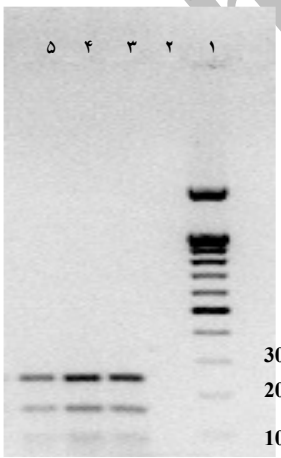
غشاءهای حاصله با بافر پری هیبریداسیون در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴-۲ ساعت در دستگاه آون هیبریداسیون قرار گرفتند. سپس برای هیبریداسیون با پروب های نشاندار شده PGRS وDR به مدت ۲۴ ساعت در همین دما در دستگاه قرار داده شدند. در مرحله بعد غشاء ها با بافرهای شستشوی ۲ برابر و ۰/۱ برابر شسته شدند و شناسایی توسط سوبستراهای NBT و BCIP انجام گرفت. در نهایت تفسیر نتایج غشاء بر اساس ظهور باندهای DNA با اندازه های متفاوت امکان پذیر شد.

نتایج و بحث

تکثیر یک منطقه ژنومی از کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (***oxyR***) و حضور باند ۵۴۸ جفت بازی و هضم آن توسط آنزیم ***Alu I*** و مشاهده ۳ ناحیه برش خورده مشخص نمود که سویه مورد استفاده در موسسه سرم سازی و واکسن سازی رازی متعلق به گونه بویس می باشد(شکل۱و۲).



شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ژن *oxyR* :ستون۱_سایز مارکر شماره ۱۰۰، ستون۲_کنترل منفی، ستون ۳_کنترل مثبت(BCG)، ستون ۴_مایکوباکتریوم بویس AN5

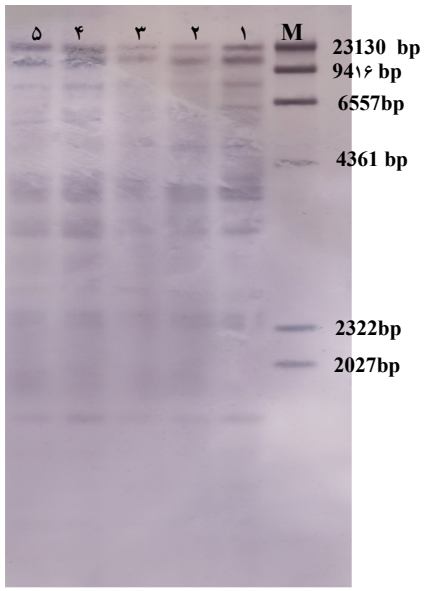


شکل۲ .الکتروفورز هضم آنزیمی محصول PCR ژن *oxyR* با آنزیم*AluI* :ستون۱_سایز مارکر شماره ۱۰۰، ستون۲_کنترل منفی، ستون ۳_کنترل مثبت(BCG)، ستون ۴و ۵_مایکوباکتریوم بویس AN5

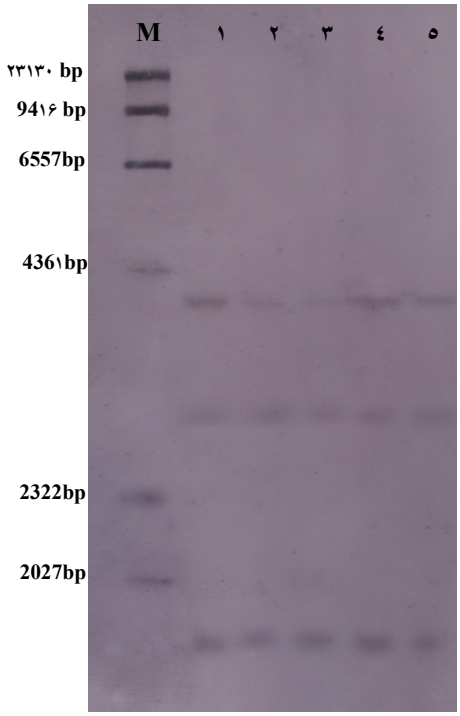
Archive of SID

www.SID.ir

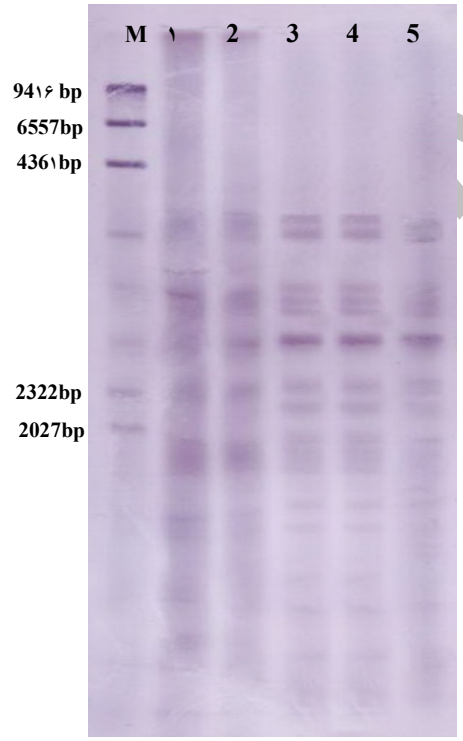
در این مطالعه از روش DR&PGRS_RFLP برای تهیه الگوی ژنومی سویه AN5 مایکوباکتریوم بویس استفاده شد. در نهایت بعد از هیبریداسیون، الگوهای ژنومی ۵ نسل متوالی به دست آمد. نتایج غشاءهای حاصل از هضم با آنزیم های *PvuII* و*AluI* و هیبرید شده با پروب PGRS ژنوم مایکوباکتریوم سویه AN5 باندهای متعدد با وزن های مولکولی متفاوت را نشان می داد که تعداد باندها و سایز ملکولیشان در تمامی نسل های مورد بررسی یکسان بودند و نتایج غشاءهای حاصل از هضم با آنزیم های *PvuII* و*AluI* و هیبرید شده با پروب DR ژنوم مایکوباکتریوم سویه AN5، هر دو حضور ۳ باند را نمایش دادند که با مقایسه با سایز مارکر شماره ۳ رش آلمان، ۳ باند حاصل از هضم توسط آنزیم *Alu I* و هیبریداسیون با پروب DR در تمام نسل های مورد بررسی در ناحیه پایین تر از ۲۰۲۷ جفت باز مشاهده شدند و از ۳ باند حاصل از هضم توسط آنزیم *Pvu II* و هیبریداسیون با پروب DR، در تمامی نسل های مورد بررسی ۲ باند در ناحیه بین ۴۳۶۱ و ۲۳۲۲ جفت بازی و یک باند در ناحیه پایین تر از ۲۰۲۷ جفت بازی مشاهده شدند. (شکل۳-*PvuII*-PGRS) (شکل۴-*PvuII*-DR) (شکل ۵-*AluI*-PGRS) (شکل ۶-*AluI*-DR)



شکل ۳ .هضم آنزیمی با *Pvu II*و هیبریداسیون با پروب*PGRS*:
M- سایز مارکر شماره ۳رش آلمان، ستون ۱- F1، ستون ۲- F2، ستون شماره ۳-F3، ستون شماره ۴ -F4 ، ستون شماره ۵-F5



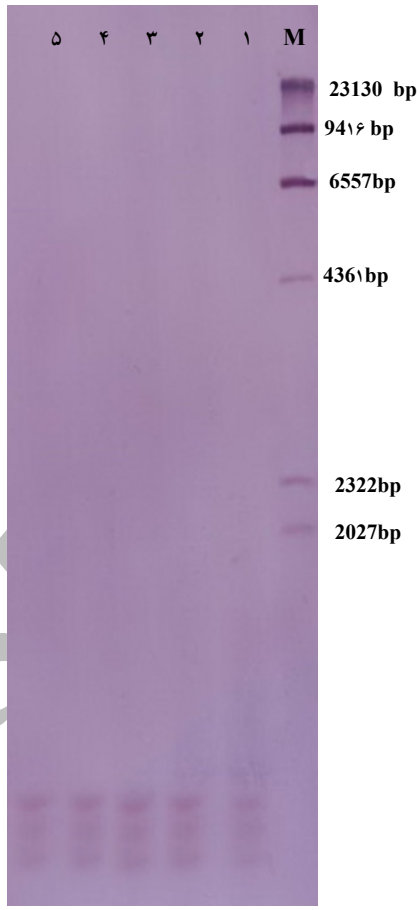
شکل ۴. هضم آنزیمی با *Pvu II*و هیبریداسیون با پروب *DR*:
M- سایز مارکر شماره ۳رش آلمان، ستون ۱- F1، ستون ۲- F2، ستون شماره ۳_F3، ستون شماره F4_4، ستون شماره F5_۵



شکل ۵. هضم آنزیمی با *Alu I*و هیبریداسیون با پروب *PGRS*: M- سایز مارکر شماره ۳رش آلمان، ستون ۱- F1، ستون ۲- F2 ، ستون شماره ۳-F3، ستون شماره ۴-F4 ، ستون شماره ۵-F5

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۶. هضم آنزیمی با *Alu I* و هیبریداسیون با پروب *DR*: M- سایز مارکر شماره ۳رش آلمان، ستون ۱- F1، ستون ۲- F2، ستون شماره ۳-F3، ستون شماره F4-4، ستون شماره ۵-F5

در سال های اخیر از مایکوباکتریوم بویس سویه AN5 در مطالعات اپیدمیولوژی به عنوان یک سویه مرجع (رفرانس) استفاده می شود. از سوی دیگر این سویه در تولید توبرکولین نیز کار برد دارد. بنابراین عدم تغییرات ژنومی این سویه در طی کشت های متوالی در شرایط آزمایشگاهی، اهمیت ویژه ای دارد. علی رغم کار برد این سویه در تکنیک های مولکولی و تولید توبرکولین، اطلاعات ژنومی اندکی از آن در دسترس است. بیشتر تحقیقاتی که تاکنون بر روی این سویه انجام گرفته، بر مبنای بهبود روش های خالص سازی و جداسازی لیپوآرابینومانان برای تهیه توبرکولین مطلوب تر، بوده است.

تا کنون مطالعات ژنومی محدودی در مورد این سویه صورت گرفته که در زیر به آنها اشاره می شود:

تحقیق کازینز و همکاران در سال ۱۹۹۸ جهت بررسی ۲۷۳ مایکوباکتریوم بویس جدا شده از کشورهای استرالیا، کانادا، جمهوری ایرلند، بریتانیا، نیوزلند و ایران از روش RFLP با استفاده از پروب های IS6110، PGRS و DR و سویه مایکوباکتریوم بویس AN5 به عنوان یک سویه استاندارد انجام پذیرفت (۹).

در سال ۲۰۰۳ و۲۰۰۸ میلادی V. Gordon وتیم تحقیقاتی سل در VLA Weybridgeکشور انگلستان مطالعات اسپولیگوتایپینگ و میکروواری نسل اول سویه AN5 انجام شد. نتایج حاصله توسط این دو تکنیک، مناسب بودن این سویه را در تولید توبرکولین گاوی تائید کرد (۶ و ۵).

در تحقیق سال ۲۰۰۸ در موسسه سرم سازی و واکسن سازی رازی، دو سویه استاندارد مایکو باکتریوم بویس **BCG (P2) 1173)** و AN5 با روش **PCR_RFLP** مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج تحقیق حاکی از رشد مناسب هر دو سویه مورد مطالعه در محیط های لوانشتین جانسون بود. حضور یک باند در ناحیه بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ جفت بازی توسط **PCR_*IS6110*** نشانگر تعلق سویهAN5 به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و تکثیر یک منطقه ژنومی از کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (***OxyR***) و حضور باند ۵۴۸ جفت بازی و هضم آن توسط آنزیم ***AluI*** و مشاهده ۳ ناحیه برش خورده، بویس بودن سویه مورد استفاده در موسسه سرم سازی و واکسن سازی رازی را اثبات کرد (۱۰). که ما نیز در تحقیق حاضر در مورد نمونه مورد نظر، این آزمایش را تکرار کرده و با مشاهده نتیجه‌ای مشابه، از مایکوباکتریوم بویس بودن سویه مورد نظرمان اطمینان حاصل کردیم.

بهره مندی از تکنیک های تایپینگ مولکولی مانند پلی مورفیسم قطعات به وسیله آنزیم های محدود کننده (RFLP) برای تهیه الگوی ژنومی کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بسیار مفید می باشد. در این بین توالی های غنی از GC بنام PGRS و رونوشت های مستقیم DR به عنوان مارکرهایی سودمند در RFLP انواع سویه های کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مورد استفاده قرار می گیرد. تکنیک مولکولی به کار رفته در این تحقیق طبق توصیه OIE انتخاب گردیده تا پلی مورفیسم

Archive of SID

www.SID.ir

نسل های متوالی *مایکوباکتریوم بویس سویه AN5* بالاترین تمایز را ایجاد می نماید (۱۱).

آنزیم *Pvu II* در روش استاندارد ارائه شده توسط ون سولینگن در دستورالعمل WHO برای انگشت نگاری ژنومی کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ارائه شده است(۱۲).

و با توجه به تجربیات دیگر محققین (۱۳) از آنزیم *AluI* نیز به طور جداگانه بویژه برای سویه های گاوی استفاده می گردد. بهره گیری از پروب PGRS برای هیبریداسیون با توجه به DNA هضم شده با آنزیم *Alu I*، تمایز بسیار قابل قبولی را برای سویه های *مایکوباکتریوم بویس* به وجود می آورد (۱۵ و ۱۴).

در تحقیقات گرونن و همکاران گزارش شده که ناحیه DR برای جدایه‌های کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* منحصر بفرد می‌باشد و در DNA *مایکوباکتریوم بویس* ب.ث.ژ. دارای سکانسهای تکرار شونده مستقیم، ۳۶ جفت بازی بوده که به وسیله سکانسهای جدا کننده اختصاصی با تغییرات ۳۶ تا ۴۱ جفت بازی در طول ژنوم مجزا گردیده است (۱۶). پلی مورفیسم DNA در جدایه‌های کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بستگی به تعداد DR ها و فاصله نواحی DR ها (تعداد سکانسهای جدا کننده بین DR ها) دارد و این باور وجود دارد که این تفاوت ها بر اساس عملکرد ریکامبینیشن DNA است (۱۶).

در تحقیق حاضر الگوهای RFLP به دست آمده از هضم آنزیمی با *Pvu II* و یا *Alu I* و هیبریداسیون با پروب های PGRS و DR نشاندار شده در تمامی نسل های مایکوباکتریوم بویس سویهAN5 مشابه بودند. همانگونه که دیگر محققین گزارش نموده اند به دلیل ژنوم بزرگ مایکوباکتریوم‌ها با دارا بودن حدود ۴/۴ جفت مگا باز تفسیر الگوی RFLP به تنهائی و بدون هیبریداسیون مشکل می نماید، در صورت انتقال DNA به غشاء و هیبریداسیون با پروب وآشکار سازی، تفسیر آن امکان‌پذیر می گردد. نتایج حاصل از هضم آنزیمی ژنوم مایکوباکتریوم بویس سویه AN5 توسط آنزیم های *Pvu II* و *Alu I* و هیبریداسیون با پروب DR، هردو بیانگر حضور سه ناحیه DR در تمامی نسل های مورد بررسی این سویه بودند که ۳ باند حاصل از هضم توسط آنزیم *Alu I* و هیبریداسیون با پروب (Directly repeated sequences) DR در تمام نسل های مورد بررسی در ناحیه پایین تر از ۲۰۲۷ جفت باز نمایان شدند و از ۳ باند حاصل از هضم توسط آنزیم *Pvu II* و هیبریداسیون با پروب DR، در تمامی نسل های مورد بررسی ۲ باند در ناحیه بین ۴۳۶۱ و ۲۳۲۲ جفت بازی و یک باند در ناحیه پایین تر از ۲۰۲۷ جفت بازی نمایان شدند.

در بررسی نتایج حاصل از هضم آنزیمی توسط آنزیم های *Pvu II* و *Alu I* و هیبریداسیون با پروب PGRS همان طور که انتظار می رفت باندهای بسیاری در نواحی مختلف مشاهده شد که تعداد باندها و وزن ملکولی آنها در تمامی نسل های مورد بررسی یکسان بودند و هیچ گونه تفاوتی مشاهده نشد.

گرچه یافته های این تحقیق که با استفاده از تکنیک DR&PGRS_RFLP و توسط آنزیم های محدود کننده *AluI* و *PvuII* انجام شد، نشان دهنده عدم تغییرات ژنومی در طی ۵ نسل متوالی مایکوباکتریوم بویس سویه AN5 کشت تهیه شده در موسسه سرم سازی رازی بود. ولی برای اطمینان بیشتر از عدم تغییرات ژنومی این سویه می توان این بررسی را در نسل های بالاتر و با آنزیم های محدود کننده و پروب های نشاندار دیگری ادامه داد و همچنین از تکنیک های دیگری از جمله میکرواری نیز استفاده نمود.

تقدیر و تشکر:

جا دارد از تمامی کارکنان محترم موسسه واکسن سازی و سرم سازی رازی به خصوص پرسنل فداکار بخش توبرکولین که در راستای تحقق اهداف این پروژه از هیچ کوششی دریغ نکردند نهایت تشکر و قدردانی به عمل آید.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1- Rastogi N; E. Legrand, et al. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev. Sci. Tech. **20**(1): 21-54.

۲- محمدی, م. (۱۳۶۶). "وضع سل دامی و آزمایش توبرکولین در ایران." انتشارات سازمان دامپزشکی: ۸۲-۹۷.

3- Mosavari N; Jamshidian M; Seifiabadi Shahpouri M; Feizabadi M; Soleimani D; Aref Pajouhi R; Soleimani K; Keshavarz R; Taheri M; Shakibamehr A; Dashtipour S, (2009). Molecular genotyping and epidemiology of the most frequent *Mycobacterium bovis* strains obtained from cattle, Iran. Fifth International M.bovis Conference 25-28.August-Wellington,New Zealand.

4- Van Soolingen D; de Haas PEW; Haagsma J; Eger T; Hermans PWM; Ritacco V; (1994). Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. J. Clin. Microbiol. **32**(10): 2425–2433.

5- Jacqueline Inwald, J. H., 2 Si Palmer,1 James Dale,1 Philip D. Butcher,2 R. Glyn Hewinson,1 and a. S. V. Gordon (2003). "Genomic Analysis of Mycobacterium tuberculosis Complex Strains Used for Production of Purified Protein Derivative." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 3929–3932.

6- M. Carmen Garcia Pelayo; J. N. G. Paul Golby; Christopher Pirson; Katie Ewer; Martin Vordermeier R; Glyn Hewinson; Stephen V; Gordon, (2009). Gene expression profiling and antigen mining of the tuberculin production strain Mycobacterium bovis AN5. Veterinary Microbiology; **133**: 272–277.

7- Vuorinen P;. Miettinen A, (1995). Direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens by Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test and Roche Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test. J. Clin. Microbiol. **33**(7): 1856-9.

8- Van Soolingen D; P. E. de Haas; (2002). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria._National Instiute of Public Health and Environment,Bilthoven, The Netherlands.

9- Cousins D. V., R. A; Skuce,(1998). Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of Mycobacterium bovis. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Tuberculosis in Animals Subsection. Int. J .Tuberc. Lung. Dis. **2**(6): 471-8.

۱۰- علوی .م، صالحی .م، مصوری. ن (۱۳۸۷). "تشخیص مولکولی جدایه های گاوی مایکوباکتریوم بویس از جدایه های انسانی و مقایسه با ۵ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ایران به روش استاندارد-PCR RFLP." مجله میکروب شناسی پزشکی ایران **۲**(۱): ۱-۷.

11- Epizooties O. I. D, (2004) Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccine.

12- Van Soolingen D; T. Hoogenboezem, (1997). A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa Int. J. Syst. Bacteriol. **47**(4): 1236-45.

13- Stahl. D.A., U. J. W, (1990). The division between fast and slow growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria. Journal of Bacteriology; **172**: 116-124.

14- Cousins D. S; Williams, (1998). Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J. Clin. Microbiol. **36**(1): 168-78.

15- Tweedle N. E. L. P,(1994). Bovine tuberculiosis control and eradication programs in Australia and NewZealand. Veterinary Microbiology; **40**: 23-39.

16- Groenen P.M.A; van Soolingen D; van Embden J.D.A, (1993). Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobactetium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method. Molecullar Microbiology; **10**: 2953-2956.

Archive of SID

www.SID.ir