فصلنامه علمی پژوهشی

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۴، پاییز ۱۳۸۸

# طراحی کنترل داخلی برای تشخیص آمیب های آزاد زی به روش PCR

لیلا ماغن[۱]، شکوه یاسایی[۲]، مژگان بنده پور[۱]، فریبا خوش زبان[۳]، افسانه بشارتی[۱]، عبدالحسین دلیمی اصل[۳]، زرین شریف نیا[۱] و بهرام کاظمی*[۱و۴] Kazemi@sbmu.ac.ir.

*۱. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی – تهران۲. سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران- تهران ۳. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی- دانشگاه تربیت مدرس – تهران ۴. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران*

## چکیده

**آمیبهای آزادزی که نخستین باردرسال ۱۹۵۸ بیماریزایی آنها به اثبات رسید سیستم عصبی مرکزی وسایرارگانهای انسان رامورد تهاجم قرارداده وسبب مرگ یامعلولیت می گردند. عدم تشخیص صحیح این انگلها، ضررجبران ناپذیربرجای می گذارد. هدف این تحقیق طراحی کنترل داخلی PCR برای تشخیص این انگلها بوده است. ازانگل آکانتوموبا کشت داده شده درازمایشگاه، DNA استخراج شد وواکنش PCRانجام گرفت. محصول PCR درون پلاسمید کلون شد و یک قطعه DNA دیگروسط این پلاسمید نوترکیب قرار داده شد و بعنوان کنترل داخلی درواکنشهای PCR استفاده گردید. DNA نمونه و کنترل دریک لوله قرارداده شدند و واکنش PCR انجام گرفت، روی ژل آگارز دو محصول PCR مربوط به نمونه و کنترل مشاهده گردید. یکی ازمزایای واکنش PCR این است که با داشتن کنترل داخلی هرگاه نمونه مورد ازمایش منفی باشد می توان در مورد صحت مواد و واکنش قضاوت نمود. مزیت این طرح درابداع تهیه کنترل داخلی واکنش PCR می باشد. چون برای تشخیص آمیب های آزاد زی باPCR همیشه سلول میزبان در نمونه نیست نمی توان ازژنهای میزبان بعنوان کنترل داخلی استفاده نمود. سازه ای که برای کنترل واکنش PCR طراحی شده است وابسته به House keeping gene میزبان نمی باشد.**

**واژگان کلیدی:** آمیب های آزاد زی، PCR ، کنترل داخلی.

## مقدمه

غیرازآمیب هیستولیتیکا که ممکن است آبسه های مغزی، ریوی یا کبدی ناشی ازیک کانون اولیه درروده بزرگ ایجاد نماید، آمیبهای پاتوژن جنس های نگلریا، آکانتاموبا (۱) و بالاموتیا ماندریلاریس (۲) می توانند موجب معلولیت سیستم عصبی مرکزی گردند که به مننگوانسفالیت آمیبی اولیـــه (PMA) وانسفالیت آمیبی گرانولومایی (GAE) شهرت دارند. موارد گزارش شده نشان میدهد که این آمیبها در سراسر دنیا گسترده میباشند. آمیب هیستولیتیکا درمناطق گرمسیر و تحت گرمسیری شایع ترازمناطق معتدله است اما آمیبهای آزاد درهرمنطقه و آب هوایی یافت میشوند (۱). شناسایی وتعیین هویت صحیح پاتوژنها درپزشکی وبهداشت ازاهمیت بالایی برخوردار است. چنانچه تشخیص وتعیین مشخصات یک عامل بیماریزا بخوبی انجام نگیرد ویااشتباهی دراین امرصورت پذیرد ممکن است ضررهای جبران ناپذیری متوجه شخص وجامعه شودزیرا نوع داروهای مورداستفاده، نحوه درمان ومانیتورینگ هرکدام ازآنها باهم متفاوت است. به علت مشکلاتی که درتشخیص وتعیین هویت میکروارگانیسم ها با روشهای سنتی

Archive of SID

www.SID.ir

مشاهده میشود تاکید محققین براین است که این کار با روشهای مولکولی انجام گیرد.

RNA ریبوزومی قسمت اصلی ریبوزوم است و نقش کد کردن mRNA به اسید های آمینه را درسلول بعهده دارد. ریبوزوم سلول های یوکاریوت دارای دو زیرواحد کوچک وبزرگ است که 18S rRNA درزیرواحد کوچک آن قرار دارد. سلولهای یوکاریوت چندین کپی از rRNA دارند که بصورت توالی های تکراری می باشند. rRNAدرهمه سلولها ثابت ترین ژن میباشد وکمترین تغییرات درآن ایجاد میشود. به این دلیل ژنهایی که rRNA را کد میکنند (rDNA) بعنوان گروه تاکسونومیک ارگانیسم گفته میشوند و میزان اختلاف گونه هارا نشان میدهد(۳). به این دلیل درطراحی کنترل داخلی برای تشخیص آمیبهای با زندگی آزاد با روش PCR ازژن rDNA استفاده گردید.

## مواد و روش ها

توسط متخصص، قرنیه چشم فردی که به علت عفونت دربیمارستان فارابی تهران بستری بود تراشیده شد و نمونه درمحیط کشت اختصاصی (non-nutrient agar plated with *E. coli*) کشت داده شد (۴). انگل آکانتاموبا رشد کرد. کشت انبوه تهیه شد وانگلها با ۸۰۰۰ دور در دقیقه توسط دستگاه سانتریفیوژجمع آوری شدند. انگلها با بافرPBS شسته شدند وتحت تاثیر بافرلیز کننده (320 mM glucose, 25 mM Tris, 5mM MgCl2, 5 mM EDTA) قرارگرفتند. با جوشانیدن محتویات واکنش، انگلها لیزشدند، با روش فنل - کلرفرم پروتئینهای واکنش حذف گردید وDNA انگل استخراج شد.

### *طراحی پرایمرو انجام PCR:*

ترادف ژن 18S rDNA آمیب های ازاد بالاموتیا، نگلریا وآکانتوموبا ازژن بانک بدست آمد وتوسط نرم افزار DNAsisباهم مقایسه شدند. ازقسمتهای مشترک توالی آنها یک جفت پرایمرطوری طراحی شدکه به هریک ازژنهای فوق اتصال یابند.

FreeA F1 5`- TCC GGA GAG GGA GCC TGA G – 3`, FreeA R1 5`- CTC CAC TCC TGG TGG TGC C – 3`

پرایمرها که تعداد ۱۰۵۶نوکلئوتیدازترادف ژن 18S rDNA آنگلهای فوق راتکثیر می کنند توسط شرکت MWG ( آلمان) سنتزشدند. واکنش PCR (مقدار ۱۰۰ نانوگرمDNA،۱/۵واحد آنزیمTaq DNApolymerase ،بافرآنزیم، ۲۰ پیکومول ازهرکدام از پرایمرها، ۲/ میلی مولار dNTP، ۱/۵ میلی مولار MgCl2 ) در حجم ۵۰ میکرولیترتهیه شد وبا شریط زیرانجام گرفت: برای دناتوراسیون اولیه، DNA به مدت ۵ دقیقه دردمای ۹۴ درجه قرارداده شد سپس مراحل PCR (دناتوراسیون در۹۴ درجه بمدت ۳۰ ثانیه، الحاق پرایمرها به DNA هدف ۵۶ درجه بمدت ۳۰ ثانیه وتوسعه پرایمرها در۷۲ درجه بمدت ۳۰ ثانیه) ۳۰ چرخه تکرار شدند (۵) و نهایتا مدت ۵ دقیقه واکنش در۷۲ درجه گرفت.

### *کلونینگ محصول PCR:*

پلاسمید Bluescript توسط آنزیم *Eco RV* (محصول شرکت فرمنتاس، لیتوانی) کهDNA را بصورت Blunt برش میدهدهضم شد. توسط آنزیم ترمینال ترانسفراز به انتهای `3 رشته های DNA پلاسمید dTTP متصل شد. آنزیم Taq DNA polymerase فعالیت ترمینال ترانسفرازی دارد وهنگام واکنش PCR به انتهاهای `3 رشته های DNA سنتز شده (محصول PCR) dATP متصل میگردد. محصول PCR بکمک آنزیم T4 DNA ligase درون پلاسمید کلون شد ( ۶). ازباکتری اشرشیا کلی با روش Hanahan سلول پذیرا تهیه شد (۷) و پلاسمید درون آن ترانسفرم شد و روی LB agar حاوی X-gal(۴- برومو، ۵- کلرو- ایندولیل - بتا دی گالاکتوزید) وIPTG (ایزوپروپیل بتا تیو گالاکتو پیرانوزید) پخش گردید. ۲۴ ساعت بعد کلنی های باکتریایی سفیدرنگ و آبی رنگ رشد کرد و کلنی های سفید رنگ که حاوی پلاسمید نوترکیب بودند (۸) انتخاب شدند و درمحیط کشت LB مایع تکثیر گردیدند. پلاسمید با روش الکالین استخراج شد (۹) و روی ژل آگارز۱/۵ درصد الکتروفورز انجام گرفت (۱۰ ).

### *تهیه کنترل داخلی PCR:*

بمنظورکنترل واکنش PCR ومهارت کاربر، باید پرایمرها بتوانند قطعه DNA دیگری را غیر از

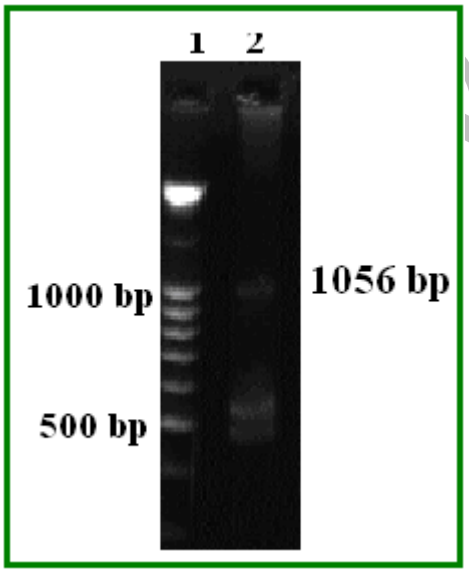
Archive of SID

www.SID.ir

محصولPCR امپلی کنند (۱۲و۱۱) بطوریکه هنگام الکتروفورز، محصول PCR این قطعه DNA روی ژل آگارز بزرگتر یا کوچکترازنوار DNA مربوط به محصول PCR مشاهده شود. دراین شرایط اگرنمونه هم منفی باشد بامشاهده محصول PCR کنترل، به صحت انجام واکنش ومهارت کاربراطمینان پیدا میکنیم. عده ای از ژنهای House keeping سلولهای میزبان بعنوان کنترل داخلی استفاده کرد اما چون تشخیص آمیب های با زندگی آزاد ازمحل های متفاوت انجام میگیرند وهمیشه سلول میزبان همراه نمونه نمی باشد، تصمیم گرفته شد یک سازه ژنی برای کنترل داخلی PCR طراحی و تهیه شود. محصول PCR برای آنزیم *PpumI* یک جایگاه شناسایی داردما پلاسمید Bluescript برای آنزیم فوق جایگاه شناسایی ندارد. پلاسمید نوترکیبی که با محصول PCR تهیه شده بود با آنزیم مذکوربرش داده شد. یک قطعه DNA حدود ۳۰۰ جفت نوکلئوتید که دو طرف آن جایگاه شناسایی آنزیم *PpumI* را داشت (ترادف پلاسمیدهای نوترکیب دیگری که درآزمایشگاه تهیه شده بودند با نرم افزار Gen runner بررسی شدند و یکی ازآنها که دو جایگاه شناسایی برای آنزیم فوق داشت انتخاب شد و توسط آنزیم هضم گردید، یک قطعه DNA با ۳۰۰ جفت نوکلئوتید ازآن جداشد) درون پلاسمید نوترکیب یعنی در وسط محصول PCR کلون شده، قرار داده شد. پلاسمید نوترکیب جدید حاوی یک Insert DNA بود که دو طرف آن ترادف پرایمرها قرارداشتند بطوری که وقتی پلاسمید نوترکیب داخل نمونه اضافه میشد هنگام واکنش PCR پرایمرها می توانستند هم روی DNA نمونه و روی DNA پلاسمید نوترکیب قراربگیرند. کمترین مقدارDNA پلاسمید نوترکیب که میتواند درواکنش PCR شرکت کند باDNA نمونه مورد آزمایش مخلوط میشود. بعد ازالکتروفورز، روی ژل دونوار DNA مشاهده میشود که یکی مربوط به محصول PCR نمونه است و دیگری که سنگین ترازمحصول PCR است مربوط به DNA پلاسمید نوترکیب (کنترل داخلی) می باشد. درصورتیکه محصول PCR مربوط به کنترل مشاهده شود نشانه انجام شدن واکنش PCR می باشد. درصورت منفی یا مثبت بودن نمونه، محصولPCR کنترل باید مشاهده شودوگرنه صحت انجام ازمایش مورد تردید می باشد.

## نتایج و بحث

از انگل آکانتاموبا که از نمونه بالینی جدا سازی وکشت داده شده بود استخراج DNA انجام گرفت. واکنشPCR انجام شدومحصول ان روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورزگردید. ژل بادستگاهUV Transilluminator مشاهده گردید، یک نوارDNA با ۱۰۵۶ جفت نوکلئوتید مشاهده گردید (شکل۱) که باآنچه موردانتظاربود تطابق داشت. محصولPCR روی ژل آگارزبا درجه ذوب پایین (Low melting point agarose) الکتروفورزشد و محصول PCR همراه کمی ژل در اطراف ان به دقت با چاقوی جراحی بریده شد، داخل لوله ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شد و با کیت مخصوص ( شرکت فرمنتاس، لیتوانی) خالص سازی شد. این محصول درون پلاسمید Bluescript کلون گردید. همچنین محصول PCR پس از خالص سازی تعیین توالی شد و در بانک ژن با شماره EF567390 ثبت گردید.



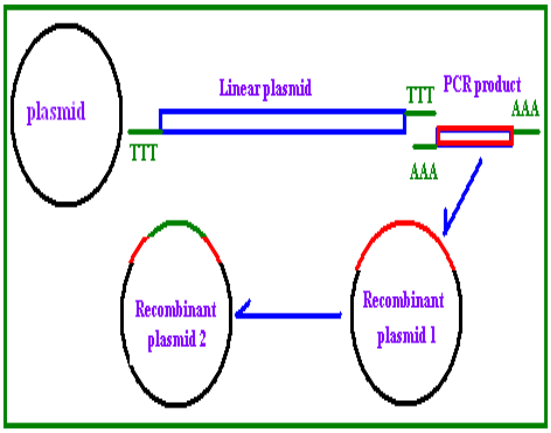

**شکل ۱. آگارز ژل الکتروفورز ستون ۱ – 100 bp DNA ladder marker**
**ستون ۲- حصول PCR از نمونه مثبت آکانتوبا**

برای تهیه کنترل داخلی PCR پلاسمید نوترکیب با آنزیم *PpumI* برش داده شد (این انزیم روی محصـــول

Archive of SID

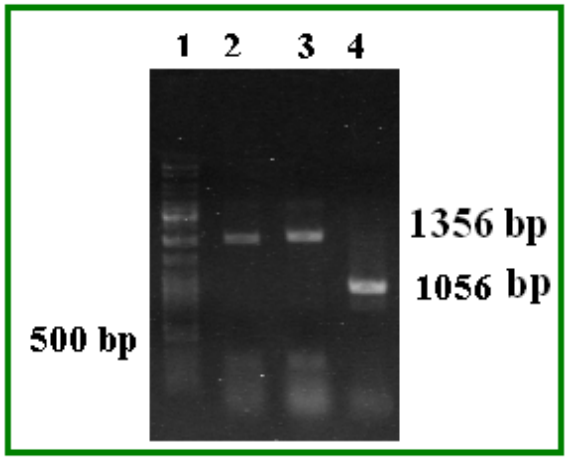
www.SID.ir

PCR یک جایگاه شناسایی دارد ولی پلاسمید برای ان جایگاه شناسایی ندارد). یک قطعه DNA که دوطرف ان جایگاه شناسایی انزیم فوق قرارداشت درون ان کلون شد (شکل ۲).




**شکل ۲. مراحل تهیه کنترل داخلی**

DNA این پلاسمید نوترکیب بعنوان کنترل داخلی به نمونه هااضافه شد و واکنش PCR انجام گرفت. روی ژل آگارز برای نمونه های مثبت دونوار DNA، یکی مربوط به واکنشPCR نمونه (۱۰۵۶نوکلئوتید) ودیگری مربوط بهPCR پلاسمید نوترکیب (۱۳۵۶نوکلئوتید) مشاهده گردید. درنمونه های منفی فقط محصول PCR مربوط به پلاسمید نوترکیب مشاهده گردید (شکل ۳).




**شکل ۳. آگارز ژل الکتروفورز ستون ۱: 100 bp DNA ladder marker**
**ستونهای ۲ و۳: محصول PCR مربوط به نمونه های مثبت و کنترل داخلی PCR**
**ستون ۴: محصول PCR مربوط به نمونه مثبت (آکانتاموبا)**

آمیبهای آزادزی سیستم عصبی مرکزی انسان و ارگانهای دیگر را (مانند چشم) مورد تهاجم قرارمی دهند وسبب مرگ یامعلولیت دائمی می گردند. شناسایی وتعیین هویت صحیح پاتوژنها ازاهمیت بالایی برخوردار است وچنانچه بخوبی انجام نگیرد ویا اشتباهی دراین امرصورت پذیرد ممکن است ضررهای جبران ناپذیری متوجه شخص یاجامعه شود. ناکارآمدی روشهای سنتی درتشخیص وتعیین هویت آمیب های آزادزی موجب شده است که اهمیت کمتری نسبت به روشهای جدید داشته باشند. محققین برای تشخیص سریع وحساس آکانتاموبا ازروش PCR (ژن 18S rDNA) استفاده کرده اند (۱۷-۱۳). عده ای نیز برای ژنوتایپینگ و تفکیک این انگل ها از PCR-RFLP استفاده نموده اند (۲۵ - ۱۸). اما هیچکدام از کنترل داخلی برای کنترل صحت کارخود استفاده نکرده اند. یکی ازمزایای واکنش PCR این است که می تواند یک کنترل داخلی داشته باشد و هرگاه نمونه مورد آزمایش منفی بود بتوان در مورد صحت واکنش و مواد استفادهشده قضاوت نمود. محققین مختلف از ژنهای House keeping سلول های میزبان برای واکنش PCR (۱۲و۱۱) و Real Time PCR درموارد دیگر استفاده کرده اند (۲۸ -۲۶). مزیت این مطالعه در ابداع تهیه کنترل داخلی واکنش PCR می باشد. چون تشخیص آمیب های با زندگی ازاد ازمحل های متفاوت انجام میگیرند وهمیشه سلول میزبان همراه نمونه نمی باشد نمی توان از یک House keeping gene بعنوان کنترل داخلی استفاده نمود. کنترل داخلی که طراحی شده است طوری است که وقتی درواکنش شرکت می کند طول محصول PCR ان بزرگتر ازمحصول PCR نمونه می باشد. این کنترل داخلی همیشه قابل استفاده است و وابسته به وجود سلولهای میزبان در نمونه نمی باشد. وقتی واکنش انجام می شود در صورت مثبت یا منفی بودن نمونه مورد ازمایش حتما" باید محصول PCR مربوط به DNA پلاسمید کنترل روی ژل مشاهده شود، درغیراینصورت برای پیدا کردن مشکل کار باید مواد شرکت کننده در واکنش PCR چک شوند. لازم به ذکر است که استفاده ازاین روش برای طراحی کنترل داخلی واکنش PCR دراین انگل ها برای اولین بارانجام گرفته است.

Archive of SID

www.SID.ir

**تقدیر و تشکر**: این پروژه با پشتیبانی مالی موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام شده است.

نویسندگان از مسئولین موسسه تشکر و قدردانی می نمایند.

**منابع:**


1- Sukthana Y, (2004). Free-living Ameba Infections: Rare but Fatal. J. Trop. Med. Parasitol; **27**: 26-36.

2- Deol I; Robledo L; Meza A; Visvesvara G.S; Andrews R.J, (2000). Encephalitis due to a free– living amoeba (Balamuthia mandrillaris) :case report with literature review. Surg. Neurol.; **53**(6): 611-616.

3- Smit S; Widmann J; Knight R, (2007). Evolutionary rates vary among rRNA structural elements. Nucleic Acids Res.; **35**(10): 3339–3354.

4- Greub G; Raoult D, (2004). Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae. Clin. Microbiol. Rev.; **17**: 413 – 433.

5- Pherson M.C; Moller M.J, (2000). PCR: The Basics from Background to Bench. Oxford, UK: BIOS Scientific publishers; 9 – 21.

6- Gaastra W; Hansen K, (1984). Ligation of DNA with T4 DNA ligase. In methods in Molecular Biology Vol. 2 Nucleic Acids. Ed,Walker JM. Humana press; Chapter 32, pp: 225-230.

7- Hanahan D, (1983). Studies on transformation on E. coli with plasmids. J. Mol. Biol.; **166**(4): 557-580.

8- Bothwell AL; Yancopulos G.D; Alt FW (1990). Methods for cloning and analysis of eu karyotic genes. Jones and Bartlett Publishers; Section 10 pp: 247-260.

9- Feliciecello I, Chinali G (1993). A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from E. coli. Anal Biochem; **212**(2): 394-401.

10- Boffey SA (1984). Agarose gel electrophoresis of DNA. In: JM W, ed. Methods in Molecular Biology Humana Press; pp: 43-50.

11- Betsou F; Beaumont K; Sueur J.M; Orfila J, (2003). Construction and Evaluation of Internal Control DNA for PCR Amplification of *Chlamydia trachomatis* DNA from Urine Samples. J. Clin. Microbiol. **41**(3): 1274–1276.

12- Rosenstraus M; Wang Z; Chang S.Y; DeBonville D; Spadoro J.P, (1998). An Internal Control for Routine Diagnostic PCR: Design, Properties, and Effect on Clinical Performance. Journal of Clinical Microbiology; **36**(1): 191-197.

13- Khan N. A; Jarroll E. L; Paget T. A, (2001). Acanthamoeba can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays.Curr. Microbiol.; **43**(3): 204-208.

14- Howe D.K; Vodkin M.H; Novak R.J; Visvesvara G. and Mclaughlin G. L, (1997). Identification of two genetic markers that distinguish pathogenic and nonpathogenic strains of acanthamoeba spp. Parasitol Res.; **83**(4): 345-348.

15- Lee S. M; Choi Y. J; Ryu H. W; Kong H. H; Chung Di, (1997). Species identification and molecular characterization of acanthamoeba isolated from contact lens paraphernalia. Korean J. Ophthalmol.; **11**(1): 39-50.

16- Mathers W. D; Nelson S. E; Lane J. L; Wilson M. E; Allen R. C; Folberg R, (2000). Confirmation of confocal microscopy diagnosis of acanthamoeba keratitis using polymerase chain reaction analysis. Arch. Ophthalmol.; **118**(2): 178-183.

17- Schroeder J. M; Booton G. C; Hay J; Niszl I. A; Seal D. V; Markus M. B; Fuerst P.A; Byers T. J, (2001). Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans wiyh keratitis and from sewage sludge. J. Clin. Microbiol.; **39**(5): 1903-1911.

18- HS Y; Hwang M. Y; Kim T. O; Yun H. C; Kim T. H; Kong H. H; Chung Di, (1999). Phylogenetic relationships among acanthamoeba spp. based on PCR-RFLP analysis of mitochondrial small subunit rRNA gene. Korean J Parasitol; **37**(3): 181-188.

19- Lai S; Asgari M; Henney H. R, (1994). Non – radioactive DNA probe and polymerase chain reaction procedures for


Archive of SID

www.SID.ir

the specific detection of acanthamoeba. Mol. Cell. Probes; **8**(1): 81-89.

20- Jonckheere De J. F; Yagita K; Endo T, (1992). Restriction – fragment – length polymorphism and variation in electrophoretic karyotype in Naegleria fowleri from Japan. Parasitol. Res.; **78**(6): 475-478.

21- Mclaughlin G. L; Brandt F. H; Visvesvare G. S, (1988). Restriction fragment length polymorphisms of the DNA of selected Naegleria and Acanthamoeba amebae. J. Clin. Microbiol; **26**(9): 1655-1658.

22- Belkum A van; Jonckheere J. De; Quint WG, (1992). Genotyping naegleria spp. And naegleria fowleri isolates by interrepeat polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology, **30** (10): 2595-2598.

23- HS Y; Choi K. H; Kong H. H; Chung Di, (2001). Genetic analyses of Acanthamoeba isolate from contact lens storage cases of students in Seoul, Korea. Korean J. Parasitol; **39**(2): 161-170.

24- Walochnik J; Haller – Schober E; Kolli H; Picher O; Obwaller A; Aspock H, (2000). Discrimination between clinically relevant and nonrelevant Acanthamoeba strains isolated from contact lens – wearing keratitis patients in Austria. J. Clin. Microbiol.; **38** (11): 3932 -3936.

25- De Jonckheere J. F, (1987). Characterization of Naegleria species by restriction endonuclease digestion of whole - cell DNA. Mol. Biochem. Parasitol; **24**(1 ): 55 – 66.

26- Schmittgen T.D; Zakrajsek B.A, (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. Journal of Biochemical and Biophysical Metods; **46** (1-2): 69-81.

27- Dheda K; Huggett J.F; Bustin S. A; Johnson M. A; Rook G; Zumla A, (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. Bio. Techniques; **37**: 112-119.

28- Jain M; Nijhawan A; Tyagi A. K; Khurana J. P, (2006). Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochemical and Biophysical Research Communication; **345**(2): 646-651.

Archive of SID

www.SID.ir