Archive of SID

مقاله پژوهشی

پروتکل روش پالس فیلد ژل الکتروفورزیس برای تایپ بندی سویه‌های اوروپاتوژنیک اشریشیاکلی

نویسندگان:

مجتبی انوری نژاد*[1]، شهره فرشاد[1]، عبدالوهاب البرزی[1]، رضا رنجبر[2]، مرضیه حسینی[1]

۱- مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

فصلنامه دانشگاه علوم پزشکی جهرم، دوره نهم، شماره دو ، تابستان ۹۰

چکیده:

مقدمه: ژل الکتروفورز در میدان ضربانی (pulsed field gel electrophoresis) یکی از بهترین روش هایی است که برای تیپ بندی و مطالعات اپیدمیولوژی در مناطق مختلف کاربرد دارد. این روش با قدرت تکرارپذیری و افتراق بالایی که دارد برای تمام پاتوژن های انسانی قابل استفاده می باشد. اما این روش بسیار حساس بوده و کوچک ترین تغییری در پارامترهای وابسته به آن باعث عدم نتیجه گیری درست می شود. با توجه به این موارد در مطالعه حاضر سعی شده است با استاندارد سازی بیش تر این روش و برطرف کردن اشکالات تکنیکی موجود در انجام آن به نتایج دقیق تری برای مقایسه سوش های مختلف در مطالعات اپیدمیولوژی دست یافت.

روش کار: در تحقیق حاضر در راستای تعیین الگوی ژنتیکی سوش های اشریشیاکلی به وسیله پروتکل ژل الکتروفورز در میدان ضربانی، پارامتر های مختلفی از جمله غلظت DNA موجود در نمونه و رابطه آن با غلظت و طول مدت زمان مورد استفاده برای آنزیم ها مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: پس از بررسی های مختلف، مناسب ترین چگالی نوری (optical density) سوسپانسیون باکتریایی در طول موج ۶۱۰ نانومتر بین ۰/۷ -۰/۶ نانومتر، غلظت آنزیم *XbaI* ۱۵۰ واحد و زمان مناسب تاثیر آنزیم پروتئیناز K هفت ساعت مشخص شد.

بحث و نتیجه گیری: به نظر می رسد که متغیر های مورد استفاده در این مطالعه برای بهینه سازی روش میدان ضربانی از اساسی ترین متغیر ها در راه اندازی یک روش کارآمد می باشند. بنابراین با رعایت نکات گفته شده، این روش ملکولی بیش از گذشته به محققین در مطالعات اپیدمیولوژی و مقایسه بین سوش های مختلف کمک خواهد کرد.

واژگان کلیدی: اشرشیاکلی، الکتروفورز، ژل، میدان ضربانی

مقدمه:

DNA پلیمری از دزوکسی ریبونوکلئوتید منوفسفات می باشد. ژل الکتروفورز در میدان ضربانی (PFGE) روشی است که در آن برش، حرکت و جابجایی بخش های بزرگ DNA کروموزومی صورت می گیرد. این بخش ها قادر به حرکت در میدان الکتریکی می باشند. این حرکت با توجه به بار الکتریکی منفی گروه فسفات در ساختمان DNA و جذب آن ها به سمت آند میدان دارای بار الکتریکی مثبت انجام می گیرد [۱].

با روش یاد شده محققین قادرند با تغییر جهت میدان الکتریکی بخش های مختلف مولکول DNA را در تمام ارگانیسم ها اعم از باکتری ها و ویروس ها تا سلول های پستانداران با وزن ملکولی 10 Mbp از یکدیگر جدا کنند [۲].

این روش در سال ۱۹۸۴ توسط شوارتز و کانتور ابداع شد [۳]. در این روش ابتدا ژنوم ارگانیسم دست نخورده در قالب های آگارز جایگذاری شده، سپس پروتئین های دیواره سلولی توسط آنزیم هضم شده و بعد از آن ژنوم ارگانیسم در محیط آزمایشگاه به وسیله آنزیم های محدودکننده (که توالی های مورد شناسایی آنها کم می باشد) برش داده می شوند. بخش های جدا شده برای هر ایزوله بین ۵-۲۰ باند مشخص می باشد که حدود اندازه آن ها بین ۱۰ Kbp - ۸۰۰ Kbp می باشد [۴ و ۵]. اگر توالی های روی DNA که آنزیم های برشی بر آن اثر می کند و فاصله بین این توالی ها در دو ایزوله با هم یک سان باشد، آن گاه الگوی باندها با یکدیگر مشابه شده و دو ایزوله به عنوان سوش های کلونال در نظر گرفته می شوند [۶ و ۷].

* نویسنده مسئول، آدرس: شیراز، بیمارستان نمازی، مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی

تلفن تماس: ۰۷۱۱-۶۴۷۴۱۶۴ دورنگار: ۰۷۱۱-۶۴۷۴۳۰۳ پست الکترونیک: manvarinejad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۰۴ تاریخ اصلاح: ۱۳۸۹/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۲/۱۱

www.SID.ir

Archive of SID

PFGE دارای قدرت تایپ بندی، تکرار پذیری و افتراق بالایی می باشد و به دلایل زیر در بین تمام روش هایی که تایپ بندی بر اساس DNA انجام می شود به عنوان روش استاندارد طلایی نامیده می شود:

۱-اندازه و تعداد باندهای ایجاد شده بر روی ژل که تفسیر نتایج را آسان می کند.

۲- قدرت تکرارپذیری زیاد

۳- قابلیت استفاده برای تمام پاتوژن های انسانی

۴- قدرت افتراق وتمایز میان سوش های غیر مربوط به هم [۸].

با این وجود، این روش دارای معایبی نیز می باشد که از مهم ترین آن ها می توان به دو مورد یکی وقت گیر بودن روش به دلیل ادغام بافرها و آنزیم در آگارز و وجود چندین مرحله انکوباسیون برای آماده سازی DNA و دیگری گران و تخصصی بودن دستگاه PFGE اشاره کرد [۸ و ۳ و ۵]. از آن جایی که آنالیز ژنوم کروموزومی با استفاده از روش مذکور یکی از بهترین روش های تیپ بندی ملکولی است، می توان با برطرف کردن اشکالات این روش هم به نتایج قابل اعتمادتری دست یافت و هم در مدت زمان انجام آزمایش صرفه جویی کرد.

روش کار:

در این مطالعه و در راستای بهینه سازی روش پالس فیلد از ۳۰ سوش اشریشیاکلی عامل عفونت های دستگاه ادراری استفاده شد که ۱۶ نمونه عامل ایجاد پیلونفریت و بقیه از بیماران مبتلا به سیستیت جدا شده بودند.

تحقیق حاضر بر اساس روش اجرناس (Ejrnaes) و با اعمال تغییراتی روی آن برای بهینه سازی روش انجام شد [۹]. روش کار به این صورت بود که ابتدا ایزوله ها روی محیط کشت مولر هینتون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به طور خالص کشت داده شدند. سپس کلنی ها را با یک سی سی سرم نمکی نرمال به وسیله لوپ مخلوط کرده و عدد چگالی نوری ۱۶ نمونه خوانده شده در طول موج۶۱۰ نانومتر بین ۱-۰/۳ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. سپس هر کدام از غلظت های مشخص شده در جدول ۱ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ سانتریفوژ شده تا رسوب میکروبی حاصل شود.این رسوب یک مرتبه با بافر سوسپانسیون (۱۰ میلی مول در لیتر Trise-Hcl PH=۸ , ۱۰۰ میلی مول در لیتر EDTA) شستشو شده و رسوب میکروبی مجدد حاصل از سانتریفوژ، با یک سی سی بافر سوسپانسیون به خوبی مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد در بن ماری قرار داده شد.

در همین زمان آگارز با نقطه ذوب پایین (LMA) ۲ درصد در بافر سوسپانسیون تهیه و تا شفاف شدن کامل آن در ماکروویو جوشانده شد. سپس یک سی سی از آن به تیوب های حاوی محلول میکروبی اضافه و پس از این که به خوبی مخلوط شد، ترکیب حاصل به درون قالب ژل منتقل شده و به مدت یک ساعت درون یخچال گذاشته تا ژل کاملاً شکل بگیرد. سپس ژل را از درون قالب با احتیاط خارج کرده، درون ارلن انداخته و به هر ارلن به ترتیب ۲۵ میلی لیتر بافر لیز کننده (۵۰ میلی مول در لیتر Tris – HCL; PH=8 , ۵۰ میلی مول در لیتر EDTA laurylsarcosin, ۱ درصد) و ۱۲۵ میکرولیتر پروتئیناز K ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر (MBI, Fermentas, Lithuania) اضافه شد به نحوی که ژل غوطه ور باشد. محلول حاصل برای مدت زمان های ۵، ۷، ۱۲و ۱۸ ساعت در دمای ۵۴ درجه سانتی گراد برای نمونه های مختلف روی دستگاه شیکر قرار داده شد.

بعد از زمان های مشخص شده، با خارج کردن محلول لیز کننده از ارلن ها، هر کدام از ژل ها را در ابتدا سه مرتبه و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه با آب مقطر استریل و سپس سه مرتبه و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه با بافر شستشو (TE) (۱۰ میلی مول در لیتر Tris- HCl، PH=۸ و ۱ میلی مول در لیتر EDTA) استریل روی شیکرانکوباتوردار و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد شستشو داده شد. سپس به کمک یک کاردک، ژل به سه قطعه کوچک تقسیم و یک قطعه از آن به درون تیوپ ایندورف استریل انتقال داده و با غلظت های مختلف ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ واحد از آنزیم XbaI (MBI, Fermentas, Lithuania) در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت در گرمخانه قرار داده شد. در مرحله بعد بافر تانک حاوی EDTA، Boric acid، Trise base با PH=۸/۳ برای جدا سازی ژنوم باکتری ها آماده و به درون دستگاه PFGE (Gene Navigator System, Amersham Bioscience, Sweden) منتقل شد. برای الکتروفورز نمونه ها با استفاده از این بافر، ژل NA Agarose (Amersham BioSciences, Sweden) به صورت ۱/۲ درصد ساخته و بعد از شکل گیری ژل، نمونه ها به درون حفره های ایجاد شده به وسیله شانه منتقل شده و با آگارز نقطه ذوب پایین ۱ درصد پوشانیده شد. پس از چند دقیقه به منظور جداسازی ژنوم، ژل به درون دستگاه انتقال یافته تا به طور کامل در بافر غوطه ور شود. در هر دفعه آزمایش در یکی از حفرها، مارکر مخصوص PFGE (PFM) به نام lambda ladder (Biolabs, New England) قرار داده تا در مراحل بعد با توجه به وزن ملکولی آن، اندازه باندهای نمونه ها تعیین شود. آزمایش برای مدت ۳۳ ساعت با شرایط درجه حرارت ۱۴ درجه سانتیگراد، زاویه بین میدان های الکتریکی ۱۲۰ درجه، ولتاژ ۶ ولت در هر سانتی متر، زمان پالس ها در فاز اولیه ۵ ثانیه و در فاز نهایی ۴۰ ثانیه انجام شد. بعد از اتمام زمان آزمایش، ژل را با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی کرده و به کمک دستگاه Gel logic 2000 (Kodak, USA) با نور UV از آن ها عکس برداری شد. سپس با استفاده از نرم افزار Photocapt، تعداد و اندازه باندهای جدا شده

www.SID.ir

Archive of SID

هر ایزوله در مقایسه با مارکر مخصوص PFGE تعیین شد و بدین ترتیب الگوهای ژنوتیپی سوش ها با یکدیگر مقایسه شدند.

یافته ها:

الگوی PFGE:

بر اساس PFGE انجام شده و مشاهده تشابه باندهای ژنتیکی، در میان ۳۰ ایزوله *E. Coli*، ۲۶ الگوی ژنتیکی به دست آمد که از S1 تا S26 نامگذاری شدند. از این الگوها شش الگو وجود داشت که درآن ها نمونه ها به صورت دو به دو با یک دیگر کاملاً مشابه بودند و در میان آن ها سویه هایی از پیلونفریت و سیستیت دیده می شد که تشابه کامل داشتند.

به منظور بدست آوردن بهترین چگالی نوری، ۱۶ سوسپانسیون باکتریایی اشریشیاکلی در غلظت های مختلف تهیه شد که چگالی نوری این سوش ها در جدول ۱ مشخص شده است.

جدول ۱: چگالی نوری مختلف اندازه گیری شده ۱۶ غلظت مختلف سوسپانسیون باکتریایی اشرشیاکلی در طول موج nm ۶۱۰ به منظور بهینه سازی الگوی ژنومی سوش های اشریشیاکلی

Isolate	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
OD	۱	۰/۳۷	۰/۹	۰/۴۵	۰/۶۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۶۸
Isolate	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶
OD	۰/۴۷	۰/۲۲	۰/۴۱	۰/۶	۰/۵۷	۰/۸۲	۰/۳۸	۰/۶۲

با توجه به الگوهای ژنتیکی بدست آمده طبق تصویر، بهترین چگالی نوری برای غلظت سوسپانسیون باکتریایی بین nm ۰/۶-۰/۷ مشخص شد که با تکرار این غلظت برای نمونه های دیگر به عنوان بهترین غلظت انتخاب شد.

در مرحله اضافه کردن آنزیم پروتئیناز K نیز زمان های ۵، ۷، ۱۲و ۱۸ساعت آزمایش شد که به استثنای زمان ۵ ساعت بقیه جواب های بدست آمده تفاوت چندانی با یک دیگر نداشتند (جدول ۲).

جدول ۲: تعداد باندهای بدست آمده در مدت زمان های مختلف اثر آنزیم پروتئیناز K بر روی هفت نمونه*E. coli*

نمونه / زمان	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
۵ساعت	۱۰	۱۱	۱۰	۹	۱۰	۱۰	۷
۷ساعت	۱۳	۱۲	۱۴	۱۴	۱۵	۱۳	۱۲
۱۲ساعت	۱۳	۱۲	۱۴	۱۴	۱۵	۱۳	۱۲
۱۸ساعت	۱۳	۱۲	۱۵	۱۴	۱۵	۱۳	۱۲

در مرحله اضافه کردن آنزیم محدود کننده نیز غلظت های مختلفی از آنزیم *XbaI* بررسی شد که با توجه به نتایج، بهترین غلظت برای آنزیم *XbaI*، ۱۵۰ واحد معین شد.

بحث و نتیجه گیری:

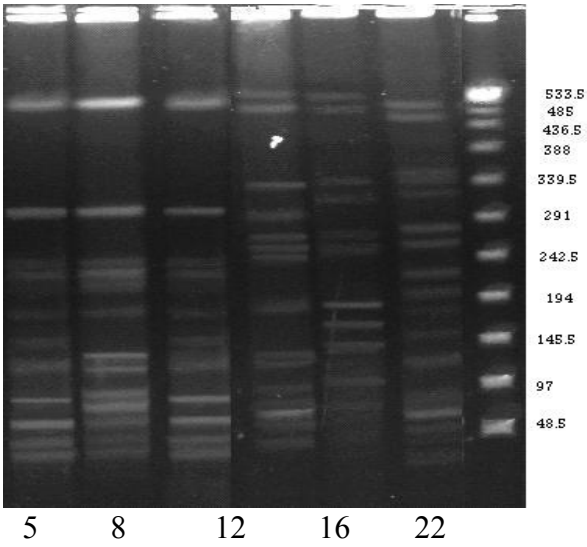
PFGE یکی از روش های ژنوتیپی است که برای تیپ بندی باکتری ها به کار می رود و به علت قدرت افتراق بالای آن در سوش های مختلف باکتریایی نسبت به روش های بیوشیمیایی ملکولی دیگر ارجحیت دارد.این روش قادر به جداسازی ژنوم بزرگ ارگانیسم ها می باشد.از آن جایی که کروموزوم باکتری ها به صورت حلقوی می باشد هضم آنزیمی ژنوم موجب به وجود آمدن تعدادی ملکول های خطی از DNA می شود [۱۰]. تفسیر الگوهای بدست آمده بر این اساس است که در صورت مشترک بودن منشا دو سوش، اگر توالی های اثر آنزیم های محدود کننده روی DNA و فاصله بین این توالی ها یکسان باشد، آن گاه الگوی ژنتیکی این دو سوش بعد از هضم آنزیمی باید یکسان باشد. بنابراین هر گونه بی دقتی در مراحل انجام PFGE ممکن است به دلیل تغییر در تعداد و اندازه های باند های هر ایزوله، موجب شود سوش های دارای دودمان مشترک به اشتباه سوش های غیر همسان تشخیص داده شوند و یا برعکس. [۷ و ۱۱]. از طرف دیگر با توجه به وقت گیر بودن روش، در مطالعه حاضر سعی شده است با بررسی موارد فنی در حین انجام آزمایش و رفع آن ها در مدت زمان کم تری به نتایج قابل اطمینان دست یافت.

در طی مطالعه حاضر تمام عوامل دخیل در جداسازی باندها برای بدست آوردن الگوی بهینه PFGE بررسی شدند (تصویر ۱). در اولین گام در مرحله تهیه سوسپانسیون باکتریایی به چند نکته باید توجه داشت. از آن جایی که در هنگام انجام الکتروفورز باید مقادیر مساوی DNA در حفره های ژل موجود باشد، بنابراین غلظت سوسپانسیون باکتریایی در تمام نمونه ها باید یکسان

www.SID.ir

Archive of SID

باشد. از طرف دیگر اگر این غلظت بیش از اندازه زیاد یا کم باشد و با مقدار آنزیمی که در مراحل بعد اضافه می شود تناسب نداشته باشد موجب عدم تاثیر آنزیم و یا بوجود آمدن باندهای بسیار کمرنگ به تعداد کم خواهد شد. برای رفع این مشکل، غلظت سوسپانسیون با دستگاه اسپکتوفتومتر اندازه گیری شد و پس از انجام بررسی های مختلف بهترین چگالی نوری تولید کننده باندها با وضوح عالی برای تمام نمونه ها بین ۰/۷-۰/۶ nm در طول موج ۶۱۰ nm مشخص شد. چگالی نوری بدست آمده برای ۱۶ سوسپانسیون مختلف باکتریایی در جدول ۱ مشخص شده است. نکته حائز اهمیت دیگر در مرحله آماده سازی سوسپانسیون، عدم به کارگیری شیکر برای مخلوط کردن نمونه است . استفاده از این دستگاه موجب از هم پاشیدگی ژنوم و در نتیجه موجب تولید باندهایی با وضوح بسیار کم و غیر قابل تفسیر خواهد شد.



تصویر۱: الگوهای بهینه الکتروفورز در میدان ضربانی چند نمونه از سوش های اشریشیاکلی. کل ژنوم ارگانیسم درون حفره ها قرار داده شد و سپس طبق روش کار ذکر شده به وسیله آنزیم *XbaI* مورد برش قرار گرفته و پس از الکتروفورز باندهای مختلف برای هر ایزوله بدست آمد. نمونه های شماره ۵ و ۱۲ به ترتیب مربوط به دو نمونه سیستیت و پیلونفریت بوده که توسط برنامه Photocap کاملاً یکسان تشخیص داده شده و نشاندهنده دودمان مشترک این دو سوش می باشد.
PM : مارکر به قدرت تفکیک 1000bp

در مرحله لیز کردن پلاگ های آگارز ممکن است به دلیل لیز نشدن ارگانیسم به مقدار کافی، پروتئین ها و ژنوم باکتری از یک دیگر جدا نشده و یکی از مهم ترین قسمت های روش پالس فیلد ژل الکتروفورزیس به صورت ناتمام باقی بماند. بنابراین در این مرحله باید چندین پارامتر مورد لحاظ قرار گیرد. در این بررسی مشخص شد که اگر سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده از مرحله قبل بسیار غلیظ باشد یا این که آگارز بکار رفته در تهیه پلاگ ها بیش از اندازه باشد، عمل لیزشدن به خوبی انجام نگرفته و باند های ایجاد شده در قسمت ژل یا بسیار کم رنگ خواهند شد یا الگوی به دست آمده نشان دهنده الگوی واقعی نمونه نخواهد بود.

اگر شستشوی پلاگ ها به صورت ناقص انجام شود، پروتئیناز K از محیط خارج نشده و در نتیجه مانع عملکرد آنزیم محدودکننده خواهد شد. بنابراین اگر احتمال داده شود که مقدار شستشو کافی نیست، باید به تعداد دفعات بیش تری تکرار شود. در این تحقیق، شستشوی سه مرتبه با بافر TE و سه مرتبه با آب مقطر استریل هر کدام به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد روی دستگاه شیکر انکوباتوردار به عنوان بهترین روش شستشو تعیین شد.

مرحله اضافه کردن آنزیم، مهم ترین مرحله در تولید الگوی ژنتیکی سوش های باکتریایی است. آنزیم مورد استفاده برای هر باکتری خاص بوده و دراین تحقیق از آنزیم *XbaI* استفاده شد. با توجه به مطالعات گذشته مشخص شده است که این آنزیم که یکی از معمول ترین آنزیم هایی است که در مطالعات سوش های اشرشیاکلی به کار برده می شود و قادر به تولید الگوی مناسبی از سوش های اشرشیاکلی می باشد. در این تحقیق نیز به طور موفقیت آمیزی از این آنزیم در افتراق ایزوله های اوروپاتوژنیک اشرشیاکلی (UPEC) و تولید باندهایی با وضوح بسیار عالی استفاده شد. به کمک آنزیم یاد شده به طور متوسط ۱۵ باند از DNA ارگانیسم جدا شده است. این آنزیم از یک گونه باکتری به نام Xanthomonas badrii جدا می شود و توالی نوکلئوتیدی

5´-T↓CTAGA…3´
3´–A GATC↑G…5´

در ژنوم ایزوله های *E. coli* را شناسایی می کند [۲ و ۱۱ و ۱۲]. مرحله افزودن آنزیم، حساس ترین مرحله آزمایش می باشد که به شدت تحت تاثیر عوامل گوناگون قرار گرفته و کوچک ترین آلودگی به مواد از جمله پروتئیناز K موجب عدم تاثیر آنزیم و در نتیجه عدم تولید باند خواهد شد. در این بررسی با توجه به غلظت سوسپانسیون باکتریایی، غلظت های مختلفی از آنزیم بررسی شد تا بهترین غلظت ممکن برای تولید تعداد باندهای مناسب با وضوح عالی بدست آید. با توجه با قیمت گران آنزیم باید در مصرف آن صرفه جویی کافی شود. دراین بررسی، غلظت ۱۵۰ واحد به عنوان غلظت مناسب انتخاب شد. اگر غلظت سوسپانسیون باکتریایی بیش از اندازه زیاد یا کم باشد و با مقدار آنزیم بکار رفته تناسب نداشته باشد، موجب عدم تاثیر آنزیم خواهد شد و باند ها به صورت غیر قابل تفسیر از یکدیگر جدا می شوند. همچنین در این تحقیق مشخص شد که اگر نمونه ها به مدت زیادی در مجاورت آنزیم قرار بگیرند باعث آسیب به

www.SID.ir

Archive of SID

ژنوم ارگانیسم و در نتیجه بروز پدیده اسمیر می شود (اطلاعات نمایش داده نشده است).

در هنگام قرار دادن پلاگ های آگارز درون حفره های ژل باید توجه داشت که هر گونه آسیب دیدگی ژنوم ارگانیسم موجب ایجاد پدیده اسمیر خواهد شد. اگر غلظت و مقدار بافر در تانک زیاد تر باشد، طبق قانون اهم (V= RI) مقاومت در تانک افزایش یافته و در طی فرایند الکتروفورز حرارت بالا می رود که این امر باعث اشکال در الگوی الکتروفورز شده و حرکت باندها مخدوش و کج نشان داده می شود. در داخل دستگاه، میدان الکتریکی به دو وضعیت شمال به جنوب و شرق به غرب ایجاد می شود و در طول مدت ۳۳ ساعت سه فاز ضربانی (پالسی) در دستگاه استفاده شد که پس از آزمایشات گوناگون و با توجه به قطعات ایجاد شده این سه فاز به صورت زیر انتخاب شدند:

فاز اول شامل ۵ ضربان بود که بدین ترتیب هر پنج ثانیه میدان الکتریکی از سمت شمال به جنوب و شرق به غرب تغییر جهت می داد. باتوجه به مدت زمان این فاز (پنج ساعت) در مجموع در این مدت ۱۴۳۸ ضربان استفاده شد.

فاز دوم شامل ۲۰ ضربان بود و جهت های میدان الکتریکی هر بیست ثانیه یکبار تغییر می کردند. مدت زمان این فاز ۱۴ ساعت و در این مدت در مجموع ۱۶۷۸ ضربان استفاده شد.

در فاز سوم هم میدان الکتریکی هر ۴۰ ثانیه یک بار از سمت شمالی جنوبی به شرقی غربی تغییر جهت داشت. مدت زمان این فاز ۱۴ ساعت و در مجموع ۱۲۵۸ ضربان استفاده شد.

در بعضی از نمونه های مورد آزمایش، در بین باندهایی که تفسیر نتایج را مشکل می کرد یک دسته باند هایی وجود داشتند که در یک خط مستقیم از یک دیگر جدا نمی شدند. بعد از بررسی های مختلف، مشخص شد که بافر درون تانک به درستی در جریان نمی باشد. بعد از رفع این اشکال، باند های جدا شده در یک خط مستقیم قرار گرفتند. باید توجه داشت اگر درجه حرارت دستگاه نیز ثابت نباشد و یا بافر داخل دستگاه کافی نباشد چنین حالتی پدیدار می شود.

در بعضی از موارد دیگر، باندها به شکل کج وخمیده از یک دیگر جدا می شدند. نرم بودن بیش از اندازه پلاگ های آگارز (کم بودن درصد آگارز آن) و یا نازک و کوچک بودن بیش از اندازه قطعات آگارز که منجر به آسیب دیدن آن ها می شود بروز چنین پدیده ای را به دنبال خواهد داشت.

در بعضی از موارد نیز هیچ گونه باندی مشاهده نشد که علت آن هم عدم تاثیر آنزیم به خاطر وجود آلودگی بود که بعد از استریل کردن تمام مواد و وسایل این مشکل نیز برطرف شد. در تصویر ۱، الگوی بهینه شده PFGE نشان داده شده است که در آن باندها با وضوح کامل از یک دیگر جدا شده اند. همان طور که قبلاً گفته شد یکی از معایب روش PFGE طولانی بودن زمان انجام آن می باشد. در این تحقیق اقدام انجام شده، کاهش زمان استفاده از پروتئیناز K به هفت ساعت بود که این امر از تخریب DNA جلوگیری می کند.

در سویه هایی مورد مطالعه، الگوی خاصی که در تظاهرات بالینی دخیل باشد دیده نشد. اما تعدادی از سویه ها با الگوی ژنتیکی کاملاً یکسان هم در سیستیت و هم در پیلونفریت نقش داشتند که نشان می دهد از یک کلون بوجود آمده اند. با توجه به بهینه سازی روش در مطالعه حاضر بهتر می توان سویه ها را از لحاظ اپیدمیولوژی مورد بررسی قرار داد. بهینه سازی این روش علاوه بر متغیر های ذکر شده، به عوامل دیگری از جمله کارکنان آزمایشگاه، مواد و تجهیزات مورد استفاده و چگونگی تنظیم و راه اندازی آزمایش نیز بستگی دارد که توجه به هر کدام از این موارد از اهمیت خاصی برخوردار است.

تقدیر و تشکر: این طرح در قالب پروژه تحقیقاتی شماره ۸۴-۲۲ در مرکز تحقیقات میکروب شناسی بالینی استاد البرزی بیمارستان نمازی شیراز انجام شده است. بدین وسیله از همکاری صمیمانه کارکنان این مرکز تشکر و قدردانی می شود.

References:

1. Townsend KM, Dawkins HJ. Field alternation gel electrophoresis. J Chromatography 1993; 618(1-2): 223-249.
2. Basim E, Basim H. Pulsed field gel electrophories (PFGE) technique and its use in molecular biology. Turk J Biol 2001; 25: 405-418.
3. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome sized DNA by pulsed field gel electrophoresis. Cell 1984; 37(1): 67-75.
4. Arbeit RD. Laboratory procedures for epidemiologic analysis of microorganisms In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al (eds). Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington DC: ASM Press; 1999: 118-127.
5. Chroma M, Kolar M. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: focus on extended - spectrum β-lactamases. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 2010; 154(4): 289–296.
6. Goering RV. Pulsed-field gel electrophoresis. In: Persing DH, Tenover Fc, Versalovic J, et al (eds). Molecular microbiology; diagnostic principles and practice. Washington DC: ASM Press; 2004: 185-196.
7. Fey PD, Rupp ME. Molecular epidemiology in the public health and hospital environments. In: Hinrichs SH, Wisecarver J (eds). Clinics in laboratory medicine, molecular methods in diagnostic microbiology. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2003: 885-901.
8. Penning TH. Electrophoretic typing. In: Sussman M (ed). Molecular medical microbiology. Barcelona: Academic Press; 2002: 542.
9. Ejrnaes K, Sandvang D, Lundgren B, et al. Pulsed field

www.SID.ir

Archive of SID

11. Chu G. Pulsed field gel electrophories: theory and practice. In: Birren B, LaiMethods E (eds). A comparison to methods in enzymology. San Diego: Academic Press; 1990: 129-142.
12. Farshad Sh, Anvarinejad M, Mehrabi Tavana A. Molecular Epidemiology of *E. coli* strains isolated from urinary tract infections in children. J Jahrom Univ Med Sci 2009; 7(1): 26-34. (Persian)

gel electrophoresis typing of *Escherichia coli* strains from samples collected before and after pivmecillinam or placebo treatment of uncomplicated community-acquired urinary tract infection in women. J Clin Microbiol 2006; 44(5): 1776-1781.
10. Wassenaar TM, Newell DG. Minireview, genotyping of campylobacter spp. App Environ Microbiol 2000; 66(1): 1-9.

www.SID.ir

Archive of SID

Original article

Pulsed field gel electrophoresis protocol for typing of uropathogenic *Escherichia coli*

Anvarinejad M[*1], Farshad Sh[1], Alborzi A[1], Ranjbar R[2], Hoseini M[1]

Received: 12/25/2010 Revised: 02/12/2011 Accepted: 05/01/2011

1. Ostad Alborzi Research Center for Clinical Microbiology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
2. Research Center for Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Journal of Jahrom University of Medical Sciences Vol. 9, No. 2 Summer 2011

Abstract

Introduction:
Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) is one of the best typing methods which is highly effective in molecular epidemiological studies in different areas. All bacterial isolates are typeable by PFGE and the results are highly reproducible. As this technique is very sensitive and the least variation in the parameter leads to lack of result or false positive, in this study we tried to optimize this method and eliminate the technical problems to obtain accurate results for comparison of different strains in epidemiological studies.

Material and Methods:
To assess the genotype pattern of *Escherichia coli* strains by PFGE method, we studied different parameters such as concentration of DNA molecules of the sample and their relationship with the enzymes concentration.

Results:
After different examinations, the best optical density for bacterial suspension in the wavelength of 610 was found to be within 0.6-0.7 nm and the best concentration of *XbaI* enzyme was 150 units. The appropriate time for proteinase K effect was 7 hours.

Conclusion:
It seems that the parameters used in this study are the most essential factors in the establishment of an effective PFGE method. With due attention to this experiment, researchers can use this method more efficiently than before for epidemiologic studies and comparison of different strains.

Keywords: *Escherichia coli*, Electrophoresis, Gel, Pulsed Field

* Corresponding author, Email: manvarinejad@yahoo.com

www.SID.ir