Original Article

انگشت نگاری DNA بر مبنای توالی‌های تکرار شونده ژنومی در گونه‌های *لاکتوباسیل*‌های بومی ایران با استفاده از REP-PCR- 5 (GTG)

فرزانه تفویضی[1*]، مریم تاج آبادی ابراهیمی[2]

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران.
۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۴/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۰۷/۰۸

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از *لاکتوباسیل‌ها* به عنوان پروبیوتیک‌ها، نیازمند به کارگیری روش‌های دقیق و قابل اطمینان جهت شناسایی باکتری‌ها در سطح سوش می‌باشد، زیرا بسیاری از خصوصیات پروبیوتیکی وابسته به سوش می‌باشد. انگشت نگاری DNA بر اساس توالی‌های تکراری ژنومی با روش REP-PCR به عنوان یک روش تایپینگ قدرتمند، جهت تعیین روابط فیلوژنیک و تاکسونومی باکتری‌ها مطرح می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی و شناسایی تنوع ژنتیک سوش‌های *لاکتوباسیل*‌های جدا شده از منابع مختلف لبنی و غذایی سنتی در ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا ۲۰ سوش از محصولات لبنی سنتی از قبیل ماست، پنیر، ترخینه و دوغ ترخینه جداسازی و خالص سازی شدند. واکنش PCR جهت شناسایی ایزوله‌ها با استفاده از پرایمرهای دجنریت انجام گرفت و محصولات PCR پس از خالص سازی، توالی سنجی شدند. انگشت نگاری DNA با پرایمر 5(GTG)جهت ژنوتایپینگ ایزوله‌ها انجام شد.

نتایج: ایزوله‌های شناسایی شده تحت عنوان *لاکتوباسیلوس کازئی*، *برویس*، *پلانتاروم* و *انتروکوکوس فاسیوم* در GenBank ثبت شدند. در پروفایل REP-PCR ۲۰ ایزوله مورد مطالعه، الگوی باندینگ متفاوتی دیده شد. روش گروه‌بندی UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYS بر روی داده‌های مولکولی انجام گرفت که با آنالیز PCO نیز تأیید گردید. در دندروگرام حاصله سه کلاستر اصلی شکل گرفت.

بحث و نتیجه‌گیری: روش REP-PCR یک روش کاربردی و بسیار حساس در تمایز ایزوله‌های مورد مطالعه می‌باشد که با نتایج حاصل از توالی یابی مطابقت کامل دارد. امید است بتوان با تهیه پروفایل‌های به دست آمده، یک بانک اطلاعاتی دقیق تهیه نمود که جهت غربالگری اولیه و در نهایت تایپینگ باکتری‌های جدا شده با صرف هزینه کمتر و با سرعت بیشتر به اجرا در آید.

کلمات کلیدی: ***لاکتوباسیلوس*، تنوع ژنتیکی، انگشت نگاری** REP-PCR- 5 (GTG)

مقدمه

لاکتوباسیل‌ها، یکی از جنس‌های مهم باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشند که نقش کلیدی در صنایع غذایی ایفا می‌کنند (۱). پژوهش‌های قبلی نشان داده است که لبنیات سنتی ایران و غذای محلی ترخینه، سرشار از باکتری‌هایی با خواص پروبیوتیکی می‌باشند (۲ و ۳). برای یک میکروب شناس غذایی در اختیار داشتن پروفایل ژنومی صحیح و دقیقی از *لاکتوباسیل‌های* موجود در غذاهای مختلف تخمیری مهم می‌باشد، چرا که ویژگی‌های پروبیوتیکی هر باکتری در ایجاد طعم، بو، حفظ بافت غذایی و دیگر خصوصیات سلامت بخشی منابع غذایی منحصر به فرد و اختصاصی در سطح گونه و حتی سوش‌های باکتری می‌باشد (۶-۴). در طی سال‌های گذشته، روش‌های مولکولی به عنوان روش‌های مؤثر در جهت شناسایی فلور غالب در جمعیت‌های میکروبی پیچیده از جمله غذاهای تخمیری مورد استفاده قرار گرفته است (۷). خصوصاً تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر PCR از جمله توالی یابی ژن 16S rRNA (۸ و ۹)، هیبریداسیون DNA-DNA (۱۰)، Riboty- ing (۱۱)، Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (۱۲ و ۱۳)، Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (۱۴)، PFGE (۱۵) و Repetitive Extragenomic Palindromic Ele ments Polymerase Chain Reaction (REP-PCR) (۱۶) به عنوان روش‌های قابل اعتماد نسبت به روش‌های رایج فنوتیپی و بیوشیمیایی بسیار ابهام‌آمیز و وقت‌گیر مورد استفاده قرار می‌گیرند. روش‌های AFLP و PFGE از جمله روش‌های دقیق و قابل اطمینان بوده ولی بسیار وقت‌گیر و پر هزینه می‌باشند و به عنوان یک تست رایج و قابل انجام در تمامی آزمایشگاه‌های تحقیقاتی قابل اجرا نبوده و به تجهیزات خاص نیاز دارند. روش RAPD، روش حساسی بوده و نیاز به بهینه سازی دقیق و کنترل شرایط آزمایش دارد که قابل اعتماد بودن آن تضمین گردد، ولیکن تکثیر نواحی تکراری ژنوم باکتریایی با

* **نویسنده مسئول: فرزانه تفویضی**، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱-۲۲۳۵۲۲۵۳
Email: tafvizi@piau.ac.ir

روش REP-PCR به عنوان یک روش قابل اعتماد جهت تاکسونومی، ژنوتایپینگ مولکولی و تعیین روابط فیلوژنی گونه‌های بسیار نزدیک به یکدیگر و حتی در تمایز سوش‌های باکتریایی یک گونه مطرح می‌باشد (۲۰-۱۷). برای مثال، این تکنیک به عنوان یک روش ارزشمند جهت شناسایی و تایپینگ باکتری‌های مختلفی از جمله *لاکتوباسیل*ها (۲۱)، *ژئوباسیل*ها (۲۲)، و *انتروکوک*ها (۲۳) به کار رفته است. از مزایای روش می‌توان به سهولت روش، سرعت کار و قابلیت اجرا در تمامی آزمایشگاه‌ها اشاره کرد. REP-PCR با انواعی از نشانگرها قابل انجام است که در میان آن‌ها، نشانگر 5 (GTG) به طور موفقیت آمیزی جهت شناسایی و مشخص نمودن گونه‌های *لاکتوباسیل‌ها* و *بیفیدوباکتریوم‌ها* مورد استفاده قرار گرفته است (۱۶ و ۲۴).

هدف از این مطالعه، شناسایی مولکولی باکتری‌های جدا شده از غذای محلی ترخینه و محصولات لبنی سنتی بر اساس توالی 16S rRNA و سپس بررسی تنوع ژنتیکی و پروفایل ژنومی سوش‌های باکتریایی مشخص شده با روش مولکولی REP-PCR بر اساس پرایمر 5 (GTG) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱- ایزوله‌های باکتریایی و شرایط کشت: باکتری‌های مورد نظر در این مطالعه، توسط تاج آبادی و همکاران در تحقیق قبلی از ترخینه، دوغ ترخینه و محصولات لبنی سنتی جداسازی و خالص سازی شدند (جدول ۱). باکتری‌هایی با ظرفیت‌های پروبیوتیکی بالا از جمله میزان تحمل به نمک‌های صفراوی، بررسی میزان جذب کلسترول، مقاومت ایزوله‌ها در شرایط اسیدی و توانایی اتصال به لاین سلولی Caco-2 (۲ و ۳) و توانایی تولید باکتریوسین (۲۵)، جهت شناسایی مولکولی بر اساس توالی‌های 16S rDNA و سپس انگشت نگاری ژنومی از طریق REP-PCR انتخاب شدند.

۲- استخراج ژنوم باکتری: جهت استخراج DNA از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها، در محیط انتخابی MRS (Man ROGOSA and SHARPE)، استفاده شد. ۲ میلی لیتر از محیط کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها به میکروتیوپ‌های ۲ میلی لیتری انتقال یافتند و در 10000rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب‌ها با بافر TEN (EDTA 100mM، NaCl 150mM، Tris Hcl 100Mm) در 10000rpm به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. به رسوب‌های حاصل، بافری متشکل از ۲۰۰ میکرولیتر بافر TEN و 4mg/ml لیزوزیم اضافه شد و به دنبال آن انکوباسیون به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد صورت گرفت. ۱۸۰ میکرولیتر بافر لیزکننده مخصوص کیت Molecular Biological System Transfer (MBST) به نمونه‌ها اضافه شد و به دنبال آن ده دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید، سپس از ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K جهت هضم پروتئینی استفاده شد. در این مرحله باید لیز کامل سلولی صورت گیرد و محلول هموژن حاصل گردد. ادامه کار بر طبق دستورالعمل کیت MBST، جذب ستونی DNA بر روی غشاء سیلیکا صورت گرفت و پس از شستشو با بافر مخصوص، استخراج DNA پایان پذیرفت. جهت بررسی کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۷ درصد استفاده شد.

۳- انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جهت تکثیر ناحیه ژنی 16S rRNA با پرایمرهای اختصاصی: جهت تکثیر ناحیه ژنی 16S rRNA از پرایمرهای دیجنریت[1] 616V, 630R تهیه شده از شرکت تکاپو زیست که توالی آن‌ها در ذیل قید شده است، استفاده شد (۲۶).
616V, 5-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3; 630R,
5-CAKAAAGGAGGTGATCC-3.

واکنش PCR متشکل از ۵۰ نانوگرم از DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر از Buffer PCR 1x که شامل (10mM Tris Hcl PH8.8, 250 mM kcl)، dNTP 200µM و 0.4µM آغازگرهای رفت و برگشت و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد.

تکثیر DNA در دستگاه (Palmcycler Gp-001،Corbet,Australia) انجام شد. دناتوره شدن DNA الگو در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه انجام گرفت و به دنبال آن واکنش تکثیری DNA در ۳۰ سیکل به شرح زیر انجام شد: دناتوره شدن در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش پرایمر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه. دناتوره شدن نهایی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و انکوباسیون نهایی به مدت ۴ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای حصول اطمینان

جدول۱: مشخصات ایزوله‌های مورد بررسی و منابعی که ایزوله‌ها جداسازی شدند

ردیف	نام ایزوله	منبع جداشده
۱	T2	ترخینه
۲	T3	ترخینه
۳	T4	ترخینه
۴	T5	ترخینه
۵	T9	ترخینه
۶	T14	ترخینه
۷	T15	ترخینه
۸	T16	ترخینه
۹	T20	ترخینه
۱۰	T22	ترخینه
۱۱	TD3	دوغ ترخینه
۱۲	TD4	دوغ ترخینه
۱۳	TD5	دوغ ترخینه
۱۴	TD10	دوغ ترخینه
۱۵	C6M3 (L2)	پنیر محلی
۱۶	C6I4	پنیر محلی
۱۷	Y1L4 (L8)	ماست محلی
۱۸	L14	ماست محلی
۱۹	Y2P3 (L16)	ماست محلی
۲۰	Y2B4	ماست محلی

1- Degenerate

از تکمیل و گسترش پرایمرها صورت گرفت. جهت آشکارسازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ با استفاده از بافر TBE 0.5 x (0.5mM EDTA, pH 8.0, 44.5 mM Tris/Borate) استفاده شد. ژل با رنگ Rima Sight DNA Stain رنگ آمیزی شد و شناسایی محصول PCR با نور uv، مورد بررسی قرار گرفت. از مارکر 100bp (Gene) Ruler, fermentas به عنوان مارکر مولکولی استفاده شد (شکل ۱). پس از خالص سازی محصول PCR، توالی یابی هر دو رشته توسط پرایمرهای 616V و 630R به کار رفته در واکنش PCR، به روش تمام اتوماتیک فلورسانس و توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام گردید.

۴- توالی یابی قطعه تکثیر یافته 16S rRNA جهت شناسایی مولکولی باکتری‌ها: نتیجه خوانش توالی‌های حاصل از دو زنجیره، جهت شناسایی Chimeric Artifact، توسط نرم افزار Vector NTI 11 مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، توالی کامل ناحیه ژنی 16S rRNA برای هر ایزوله حاصل شد. برای شناسایی توالی‌های 16S rRNA ایزوله‌های مورد مطالعه، از برنامه Blastn در پایگاه NCBI BLAST Search tool به آدرس http:/www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST استفاده شد.

۵- انگشت نگاری ژنومی بر اساس روش DNA: REP-PCR
ژنومی استخراج شده از ایزوله‌های مورد نظر جهت انجام REP-PCR با پرایمر (5'-GTGGTG GTG GTG GTG-3') 5 (GTG) گزارش شده در تحقیق Gevers (۱۶) مورد استفاده قرار گرفت. پرایمر مورد نظر از شرکت تکاپو زیست تهیه گردید. واکنش REP-PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به شرح ذیل بهینه سازی شد: واکنش PCR متشکل از ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر از Buffer PCR 1x که شامل (10mM Tris Hcl pH8.8, 250 mM kcl)، 200µM dNTP و 0.8µM پرایمر GTG5 و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. تکثیر DNA در دستگاه (Palmcycler Gp-001،Corbet,Australia) انجام شد. دناتوره شدن DNA na DNA در ۳۰ سیکل به شرح زیر انجام شد: دناتوره شدن در ۹۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۳/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش پرایمر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه. انکوباسیون نهایی به مدت ده دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای حصول اطمینان از تکمیل و گسترش پرایمرها صورت گرفت. جهت آشکار سازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ با استفاده از بافر TBE 0.5 x (0.5 mM EDTA, pH 8.0, 44.5 mM Tris/Borate استفاده شد. ژل با رنگ Rima Sight DNA Stain رنگ آمیزی شد و با نور uv، مورد بررسی قرار گرفت. مارکر (GeneRuler,fermentas 100bp) به عنوان مارکر مولکولی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۲).

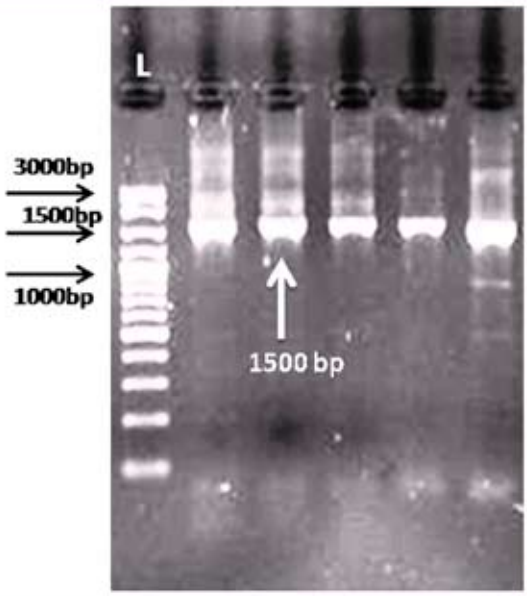
۶- آنالیزهای آماری داده ها: نشانگرهای REP به صورت دو حالته می‌باشند. بدین صورت که حضور باندها با کد ۱ و عدم حضور باندها با کد صفر مشخص می‌شود. پس از ارزش گذاری نشانگر 5 (GTG) به طریق فوق، آنالیزهای آماری زیر بر روی داده‌ها انجام گرفت. ضریب تشابه Dice در بین ایزوله های مورد مطالعه محاسبه شد و گروه بندی ژنوتیپ‌ها با نرم افزار NTSYS-PC (Ver. 2.02) و با استفاده از روش‌های UPGMA ((Unweighted Pair Group Method by Arithmetic Average و آنالیز PCO (Principal Coordinate Analysis) با نرم افزار DA-WIN ver. 5 انجام گرفت. دندروگرام های حاصل از دو روش با یکدیگر مقایسه شدند. بررسی همبستگی بین ماتریس کوفنتیک و ماتریس تشابه به عنوان معیاری جهت ارزیابی نیکویی برازش خوشه بندی مورد استفاده قرار گرفت. همچنین به منظور تعیین همبستگی بین ماتریس های تشابه از آزمون مانتل استفاده شد (۲۷).

نتایج

شناسایی اختصاصی گونه در باکتری‌های جدا شده: واکنش PCR بهینه شده جهت شناسایی اختصاصی گونه با پرایمرهای 616V و 630R در باکتری های مورد نظر سبب تکثیر قطعه تقریبا 1500bp در ایزوله های مذکور گردید (شکل ۱). پس از خالص سازی محصول PCR، توالی یابی دو طرفه قطعه مورد نظر با پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت. پس از انجام توالی یابی، مقایسه هم ردیفی در پایگاه NCBI Blastn انجام شد و ۹۹٪ تشابه با *لاکتوباسیلوس کازئی*، برای ایزوله های L8، L2، Y2B، TD10، TD4، T22، T20، T16، T14، T4، T3، T2، L16، ۹۹% تشابه با *لاکتوباسیلوس برویس* برای ایزوله های T15، T9، L14، TD3 TD5، ۹۷% تشابه با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای ایزوله T5 و ۹۷٪ تشابه با *انتروکوکوس فاسیوم* برای ایزوله C6I4 حاصل شد. بر طبق میزان تشابه به دست آمده حاصل از Blastn، ایزوله های مورد مطالعه به گروه های *لاکتوباسیلوس کازئی*، *برویس*، *پلانتاروم* و *انتروکوکوس فاسیوم* تعلق یافتند. بنابراین، ۱۳ سوش مختلف و جدید *لاکتوباسیلوس کازئی*، پنج سوش جدید از *لاکتوباسیلوس برویس*، یک سوش جدید از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و یک سوش جدید از *انتروکوک فاسیوم* شناسایی شد که توالی سوش های مذکور با شماره دست یابی‌های *Lactobacillus casei strain L2 (JQ412725)*، *Lactobacillus casei strain L8 (JQ412726)*، *Lactobacillus casei strain L16 (JQ412728)*، *Lactobacillus casei strain T2 (JQ301797)*، *Lactobacillus casei strain T3 (JQ771071)* *Lactobacillus casei strain T4 (JQ301798)*، *Lactobacillus casei strain T14 (JQ771072)*، *Lactobacillus casei strain T16 (JQ771073)*، *Lactobacillus casei strain T20 (JQ412730)*، *Lactobacillus casei strain T22 (JQ412731)*، *Lactobacillus casei strain TD4 (JQ412732)*، *Lactobacillus casei strain TD4 (JQ412732)*، *Lactobacillus casei strain TD10 (JQ412734)*، *Lactobacillus casei strain Y2B4 (JQ412735)*، *Lactobacillus casei strain L14 (JQ412727)* ، *Lactobacillus casei strain T9 (JQ301799)*، *Lactobacillus casei strain T15 (JQ412729)*، *Lactobacillus casei strain TD3 (JQ771074)*، *Lactobacillus casei strain TD5 (JQ412733)*، *Lactobacillus Plantarum strain T5 (JQ301796)* و *Enterococcus faecium strain C6I4 (JQ771070)* در پایگاه اطلاعاتی GenBank ثبت شدند.

بررسی تنوع ژنتیکی حاصل از نتایج REP-PCR: بررسی پروفایل ژنومی ایزوله ها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت. تمامی باندهای تکرارپذیر و واضح در محدوده 250-2500bp بر اساس کد صفر و یک امتیازدهی شدند (شکل ۲). در مجموع ۱۶ باند پلی مرف حاصل گردید. باند 300bp تنها در ایزوله های TD10 و TD5 مشاهده شد و در دیگر ایزوله ها تکثیر نیافت. باند 1100bp، در تمامی ایزوله ها دیده شد به

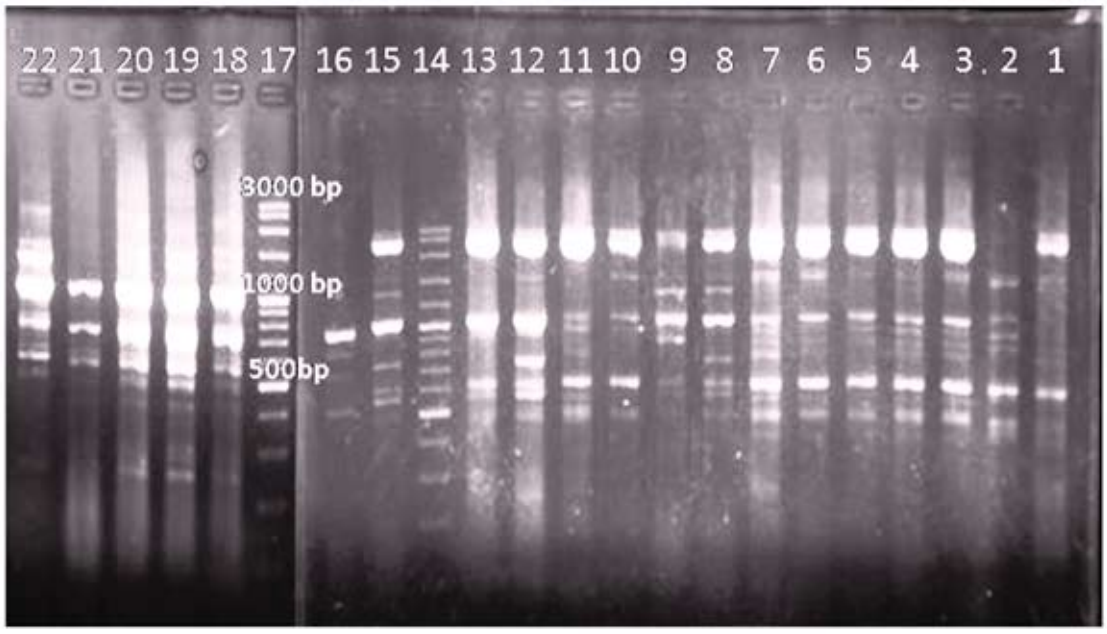
غیر از ایزوله ۲. به عبارتی می‌توان باند 1100bp را به عنوان باند مشترک در تمام ایزوله‌ها به حساب آورد. تعداد کل باندهای شمارش شده در ایزوله‌ها، ۱۴۸ عدد محاسبه گردید. ایزوله‌های TD5 و TD10 با ۱۱ باند، بیشترین تعداد باندهای تکثیر یافته و ایزوله‌های T5 و ۱۴ با ۴ باند کمترین باندهای تکثیر یافته توسط پرایمر 5 (GTG) را به خود اختصاص دادند. بر طبق ضریب تشابه محاسبه شده، بیشترین تشابه ژنتیکی بین ایزوله‌های T20 و T16 حاصل شد. بیشترین تفاوت ژنتیکی نیز بین ایزوله‌های TD5 و TD4 مشاهده شد. باکتری‌ها در سه کلاستر اصلی در دندروگرام گروه‌بندی شدند. باکتری‌های L8، L2، TD10، TD4، T22، T20، T16، T14، T4، T3، T2، L16، در کلاستر I، باکتری T5 در کلاستر II و باکتری‌های T9، TD3، TD5، T15 و ۱۴ در کلاستر III قرار گرفتند (اشکال ۳ و ۴).



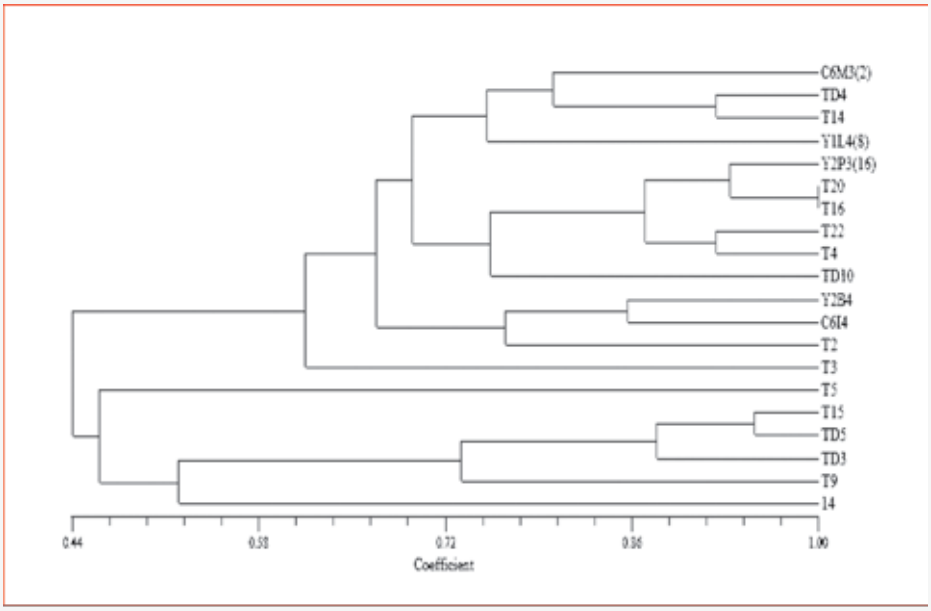
شکل ۱: نمایش محصول PCR (قطعه 1500 bp) حاصل از تکثیر ژن ۱۶S rRNA در تعدادی از ایزوله‌های مورد مطالعه به همراه fermentas (L) DNA Ladder بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد.

بحث

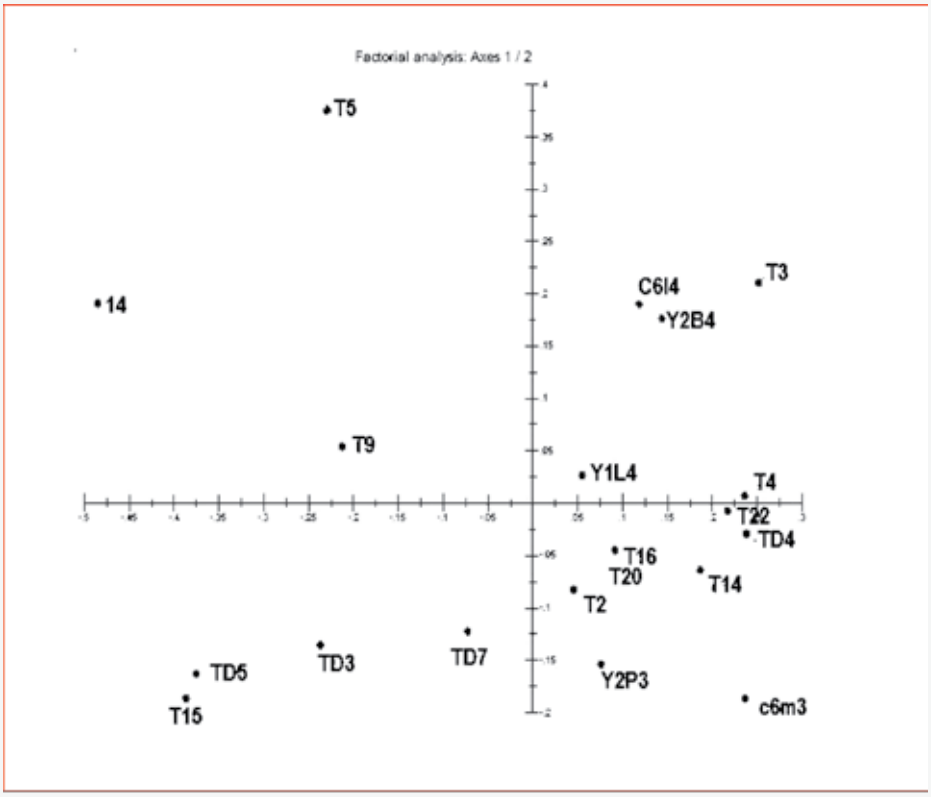
محصولات لبنی محلی و غذاهای تخمیری سنتی سرشار از باکتری‌های پروبیوتیک بوده که وجود خواص مفید و سلامت بخشی آن‌ها مدیون فعالیت‌های این دسته از باکتری‌هاست. چند سالی است که جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک موجود در محصولات مختلف لبنی سنتی در سرتاسر دنیا و نیز در ایران مورد توجه محققین قرارگرفته است. به کارگیری روش‌های مرسوم بیوشیمیایی مانند تخمیر قندها، تولید گاز و ... از جمله روش‌های مرسوم در شناسایی باکتری‌ها به شمار می‌رود و لیکن این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی می‌باشند که از آن جمله می‌توان به صرف وقت و هزینه و نیز ابهام آمیز بودن نتایج آزمایشات اشاره کرد (۲۸ و ۲۹). بنابراین به کارگیری تکنیک‌های مولکولی مختلف سبب رفع مشکلات فوق‌الذکر گردیده است. از طرفی در فرآیند جداسازی همواره جمعیت انبوهی از باکتری‌ها جداسازی و خالص سازی می‌شوند که همواره تعدادی از این باکتری‌ها، سوش‌های یکسانی از باکتری‌های



شکل ۲: الگوی باندی تکثیر شده ایزوله‌های مورد مطالعه توسط پرایمر 5 (GTG). اعداد به ترتیب معرف:
1:C6M3, 2:Y1L4, 3:Y2P3, 4:T20, 5:T22, 6:TD4, TD10, 8:Y2B4, 9:T3, 10:T14, 11:T16, 12:T2, 13:T4, 14:DNA ladder 100 bp fermetas, 15:C6I4, 16:T5, 17:DNA ladder, 18:T15, 19:TD5, 20:14, 21:TD3, 22:T9 می‌باشند.



شکل ۳: دندروگرام حاصل از تجزیهٔ خوشه ای ایزوله های جدا شده با روش UPGMA و ضریب تشابه Dice توسط نرم افزار NTSYS-PC



شکل ۴: آنالیز PCO ژنوتیپ های جدا شده بر اساس مارکر (GTG)5 توسط نرم افزار داروین

یک گونه می‌باشند. بنابراین انتخاب یک روش مولکولی دقیق و قابل اطمینان و به تبع آن، بهنیه سازی در وقت و هزینه از ضروریات امر می‌باشد. یکی از روش های دقیق در شناسایی مولکولی، توالی یابی RNA ریبوزومی باکتریایی می‌باشد که در این تحقیق نیز توالی یابی ناحیه 16S rRNA مورد استفاده قرار گرفت. این قسمت از ژنوم دارای نواحی متغیر و حفاظت شده می‌باشد که تفاوت سوش ها، حاصل تفاوت در نواحی متغیر می‌باشد. محققین با طراحی پرایمرهای مختلف اقدام به تکثیر این ناحیه و شناسایی باکتری ها با توالی یابی قطعه مورد نظر شده‌اند (۳۳-۳۰). در این تحقیق نیز به کارگیری روش توالی سنجی باکتری های جدا شده از منابع مختلف

لبنی سنتی و غذای محلی ترخینه تحت عنوان *لاکتوباسیلوس کازئی*، *برویس*، *پلانتاروم* و *انتروکوک فاسیوم* شناسایی شده و اطلاعات آن ها در GenBank ثبت شدند. در گروه *لاکتوباسیلوس کازئی* (۷ باکتری جداشده از ترخینه، ۲ باکتری جدا شده از دوغ ترخینه، ۳ باکتری جدا شده از ماست و ۱ باکتری جدا شده از پنیر)، در گروه *لاکتوباسیلوس برویس* (۲ باکتری جدا شده از ترخینه، ۲ باکتری جدا شده از دوغ ترخینه و ۱ باکتری جدا شده از ماست)، در گروه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (یک باکتری جدا شده از ترخینه) قرار داشت. روش تایپینگ دیگری که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، انگشت نگاری REP-PCR با کمک پرایمر 5 (GTG) بود. این روش اولین بار توسط Versolic در سال ۱۹۹۱ (۳۴) جهت تایپینگ باکتری های منفی به کار برده شد. بعدها محققین دیگری از این روش جهت ژنوتایپینگ باکتری های گرم مثبت استفاده کردند و تجربیات نشان داده است که این نشانگر دارای قدرت تفکیک بالایی در متمایز نمودن باکتری ها از هم می‌باشد.

REP-PCR با استفاده از نشانگر 5 (GTG) توسط Gevers و همکاران در سال ۲۰۰۱ (۱۶) جهت شناسایی لاکتوباسیل ها به کار گرفته شد. Sevec و همکاران در سال ۲۰۰۵ و ۲۰۰۹ جهت شناسایی *لاکتوباسیل* ها از نمونه های انسانی (۲۳ و ۳۵) و Scheir link در سال ۲۰۰۷ و Vag Hoorde در سال ۲۰۰۸ جهت شناسایی *لاکتوباسیل* های جدا شده از منابع غذایی این تکنیک را به کار بردند (۳۶ و ۳۷).

پروفایل حاصل از نتایج REP-PCR با پرایمر 5 (GTG) در مطالعه حاضر نیز گویای قدرت تفکیک بالای این روش در متمایز نمودن باکتری های جدا شده و مطالعه فیلوژنتیک آن‌ها می‌باشد. با توجه به دندروگرام رسم شده با روش UPGMA، سه کلاستر اصلی در دندروگرام به چشم می‌خورد. هر کدام از کلاسترهای اصلی، دارای کلاسترهای کوچک تری می‌باشند. نظم خاصی در کلاستر به چشم می‌خورد. به طوری که سوش های T9، TD3، TD5، T15 و ۱۴ در کلاستر III گروه بندی شدند، که این امر نشان دهنده تشابه ژنتیکی این ژنوتیپ ها با یکدیگر می‌باشد. بیشترین تشابه ژنتیکی نیز بین دو ایزوله T15 و TD5 در این گروه به چشم می‌خورد که الگوی انگشت نگاری ژنومی نیز آن را تایید می‌کند. ایزوله ۱۴ نسبت به بقیه ژنوتیپ ها در این کلاستر با فاصله قرار گرفته و در یک گروه مجزا گروه بندی شده است که نشان دهنده تفاوت ژنتیکی این سوش با بقیه سوش های *برویس* جدا شده می باشد. توالی یابی انجام یافته تاییدی بر این موضوع می‌باشد زیرا با انجام توالی سنجی، این باکتری ها تحت عنوان سوش های جدیدی از *لاکتوباسیلوس برویس* معرفی گردیدند. از طرفی باکتری T5 در کلاستر جداگانه II و با حفظ فاصله ژنتیکی نسبت به ایزوله های کلاستر III قرار گرفته است که خود گویای وجود تفاوت ژنتیکی در کل ژنوم نسبت به سایر ایزوله هاست که این نتیجه با نتیجه توالی یابی ایزوله فوق تطابق کامل دارد. توالی سنجی ناحیه 16S rRNA نمایانگر سوش جدید و بومی از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* می‌باشد. مابقی سوش ها اعم از TD10، TD4، T22، T20، T16، T14، T4، T3، T2، L16، L8، L2 کلاستر بزرگ I را تشکیل دادند. تمامی ایزوله های قرارگرفته در این کلاستر دارای تشابه ژنتیکی بیشتری با یکدیگر بوده و بر طبق نتیجه توالی یابی نیز تحت عنوان سوش های *لاکتوباسیلوس کازئی* شناخته شدند. با توجه به دندروگرام ایزوله T20 و T16 دارای بیشترین تشابه ژنتیکی با یکدیگر می‌باشند و T3 بیشترین تفاوت ژنتیکی را با بقیه ژنوتیپ ها نشان می‌دهد و با فاصله نسبت به بقیه ژنوتیپ ها قرار گرفته است. در الگوی تکثیری REP-PCR، ۱۶ باند در محدوده 250-2500bp مشاهده شد که هر ۱۶ باند، پلی مرف بودند که این امر دلالت بر وجود تنوع ژنتیکی در ایزوله ها و توان بالای نشانگر 5 (GTG) در انگشت نگاری ژنومی و شناسایی سوش های مختلف یک گونه می‌باشد. بررسی نتایج پروفایل حاصله حاکی از قدرت تمییز نشانگر 5 (GTG) بین گونه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی*، *برویس*، *پلانتاروم* و حتی سوش‌های مختلف *لاکتوباسیلوس کازئی* و *برویس* می‌باشد. قبلا نیز Gevers و همکاران در سال ۲۰۰۱ با به کارگیری مارکر 5 (GTG) موفق به متمایز نموده *لاکتوباسیلوس پنتسوس*، *پلانتاروم*، *پارا پلانتروم*، *لیمنتاریس* و *پارالیمنتاریس* شدند (۱۶). از مزایای روش می‌توان به سهولت انجام کار، تسریع در انجام آزمایش، تکرار پذیری، صرف هزینه کمتر و شناسایی دقیق ژنوتیپ ها اشاره نمود. چرا که حتی توالی یابی نیز دارای محدودیت‌هایی می‌باشد؛ از جمله در مواردی نیاز به تکرار دارد، هزینه بیشتری می‌طلبد و در شناسایی سوش های مختلف یک گونه که ممکن است در حد چند نوکلئوتید با هم تفاوت داشته باشند ناتوان است.

نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر نشان دهنده کارایی انگشت نگاری ژنومی REP-PCR با کمک نشانگر 5 (GTG) در بررسی روابط فیلوژنیک و تنوع ژنتیکی باکتری‌های گرم مثبت از جمله *لاکتوباسیلوس*ها می‌باشد. از آنجایی که روش توالی یابی به عنوان یک روش دقیق و مورد اطمینان مطرح می‌باشد، ژنوتایپینگ انجام شده با روش REP-PCR کاملا با روش توالی یابی تایید گردید. امید است بتوان با تهیه پروفایل‌های به دست آمده، یک بانک اطلاعاتی دقیق تهیه نمود که جهت غربالگری اولیه و در نهایت تایپینگ باکتری‌های جدا شده با صرف هزینه کمتر و با سرعت بیشتر به اجرا در آید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند به جهت تامین هزینه مالی این تحقیق قدردانی می‌نمایند.

References

1. El Soda M. The MagicWorld of Lactic Acid Bacteria. Proceedings of the Symposium on Starter Cultures and Their Use in Dairy Industry. 1999; Alexandria, pp. 1–12.
2. Tajabady Ebrahimi M, Bahrami H and Ziary Z. Tarkhineh

source of probiotic lactic acid bacteria. The Quarterly Journal of Biological Sciences, Islamic Azad University Zanjan. 2011;4(12):1-9. [Article in Persian]
3. Tajabady Ebrahimi M, Ouwehand AC, Hejazi MA, Jafari P. Traditional Iranian dairy products: A source of potential probiotic lactobacilli. Afr J Microbiol Res. 2011;5(1):20-27.
4. Ben Amor K, Vaughan EE, De Vos WM. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. The Journal of Nutrition. 2007;137:741–747.
5. Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. JCM. 1999;37:1661–1669.
6. Temmerman R, Scheirlinck I, Huys G, Swings J. Culture- independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol. 2003;69:220–226.
7. De Urraza PJ, Gómez-Zavaglia A, Lozano ME, Romanowski V, De Antoni GL. DNA fingerprinting of thermophilic lactic acid bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. J Dairy Res. 2000;67:381–392.
8. Kullen MJ, Sanozky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA for rapid and accurate identification of bacteria in the Lactobacillus acidophilus complex. J Appl Microbiol. 2000;89:511-516.
9. Singh S, Goswami P, Singh R, Heller KJ. Application of molecular identification tools for Lactobacillus, with a focus on discrimination between closely related species: a review. LWT-Food Sci Technol. 2009;42:448–457.
10. Pot B, Hertel C, Ludwig W, Descheemaeker P, Kersters K, Schleifer KH. Identification and classification of Lactobacillus acidophilus, L. gasseri and L. johnsonii strains by SDS-PAGE and rRNA target oligonucleotide probe hybridisation. J Gen Microbiol. 1993;139:513-517.
11. Rodtong S, Tannock GW. Differentiation of Lactobacillus strains by ribotyping. Appl Environ Microbiol. 1993;59:3480-3484.
12. Du Plessis EM, Dicks LMT. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus amylovorus, Lactobacillus gallinarum, Lactobacillus gasseri and Lactobacillus johnsonii. Curr Microbiol. 1995;31:114-118.
13. Roy D, Ward P, Vincent D, Mondou F. Molecular identification of potentially probiotic lactobacilli. Curr Microbiol. 2000;40:40-46.
14. Gancheva A, Pot B, Vanhonacker K, Hoste B, Kersters K. A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to Lactobacillus acidophilus and related species. Syst Appl Microbiol. 1999;22:573-585.
15. Busse HJ, Denner EBM, Lubitz W. Classification and identification of bacteria-current approaches to an old problem -overview of methods used in bacterial systematics. J Biotechnol. 1996;47:3-38.
16. Gevers D, Huys G, Swings H. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. FEMS Microbiol Lett. 2001;205:31–36.
17. Kesmen Z, Yetiman AE, Gulluce A, Kacmaz N, Sagdic O, Cetin B, et al. Combination of culture-dependent and culture-independent molecular methods for the determination of lactic microbiota in sucuk. Int J Food Microbiol. 2012;153:428–435.
18. Giorgio Bove C, De Dea Lindner J, Lazzi C, Gatti M, Nevian E. Evaluation of genetic polymorphism among Lactobacillus rhamnosus non-starter Parmigiano Reggiano cheese strains. Int J Food Microbiol. 2011;144:569–572.
19. Mohammed M, Abd El-Aziz H, Omran N, Anwar SH, Awad S, El-Soda M. Rep-PCR characterization and biochemical selection of lactic acid bacteria isolated from the Delta area of Egypt. Int J Food Microbiol. 2009;128:417–423.
20. Manzano M, Giusto C, Iacumin L, Cantoni C, Comi G. Molecular methods to evaluate biodiversity in Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis strains from different origins. Food Microbiol. 2009;26:259–264.
21. Hurtado A, Reguant C, Bordons A, Rozès N. Evaluation of a single and combined inoculation of a Lactobacillus pentosus starter for processing cv. Arbequina natural green olives. Food Microbiol. 2010;27:731-740.
22. Meintanis C, Chalkou KI, Kormas KA, Lymperopoulou DS, Katsifas EA, Hatzinikolaou DG, et al. Application of rpoB sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus Geobacillus. Lett Appl Microbiol. 2008;46:395–401.
23.˘Svec P, Vancanneyt M, Seman M, Snauwaert C, Lefebvre K, Sedla˘cek I, et al. Evaluation of (GTG)5-PCR for identification of Enterococcus spp. FEMS Microbiol Lett. 2005;247:59–63.
24. Krizova JA, Spanova A, Rittich B. RAPD and rep-PCR Fingerprinting for Characterization of Bifidobacterium Species. Folia Microbiol. 2008;53(2):99–104.
25. Tajabady EM, Ouwehand A, Jafari P, Bahrami H, Heidary Nasrabadi M. Evaluation probiotic effects of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh. International Scientific Conference on Probiotic and prebiotic; 2011 June 14-16, Slovakia.
26. Ehrmann MA, Mu¨ller MRA, Vogel RF. Molecular analysis of sourdough reveals Lactobacillus mindensis sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53:7–13.
27. Vauterin L, Vauterin P. Computer aided objective comparison of electrophoretic patterns for grouping and identification of microorganisms. Eur Microbiol. 1992;1:37–41.
28. Callon C, Millet L, Montel MC. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. J Dairy Res. 2004;71:231–244.
29. Lick S. Review: Typing systems for lactobacilli. Milchwissenschaft. 2003;58:256–260.
30. Woese CR. Bacterial evolution. Microbial Rev. 1987;51:221-71.
31. Vandamme P, Pot B, Gillis V, de Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microb Rev. 1996;60:407-438.

32. Stackebrandt E, Rainey FA. Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies, p. 1-17. In: A. D. L. Akkeramns, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht; 1995.
33. Collins MD, Rodrigues U, Ash C, Aguirre M, Farrow JAE, Martinez-Murcia A, et al. Phylogenetic analysis of the genus Lactobacillus and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiol Lett. 1991;77:5-12.
34. Versalovic J, Koeuth T, Lupski J. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 1991;19(24):6823 -6831.
35. Švec P, Sedláček I, Žáčková L, Nováková D, Kukletová M. Lactobacillus spp. associated with early childhood caries. Folia Microbiol. 2009;54:53–58.
36. Scheirlinck I, Van der Meulen R, Van Schoor A, Vancanneyt M, De Vuyst L. Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs. Appl Environ Microbiol. 2007;73:6262–6269.
37. Van Hoorde K, Verstraete T, Vandamme P, Huys G. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. Food Microbiol. 2008;25:929–935.

Original Article

DNA Fingerprinting Based on Repetitive Sequences of Iranian Indigenous *Lactobacilli* Species by (GTG) 5- REP-PCR

Tafvizi F[1*], Tajabadi Ebrahimi M[2]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Department of Biology, Faculty of Science, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Recieved Date: 2012/07/12 Accepted Date: 2012/09/29

Abstract

Background & Objective: The use of *lactobacilli* as probiotics requires the application of accurate and reliable methods for the detection and identification of bacteria at the strain level. Repetitive sequence-based polymerase chain reaction (REP-PCR), a DNA fingerprinting technique, has been successfully used as a powerful molecular typing method to determine taxonomic and phylogenetic relationships among bacteria. The aim of this study was to evaluate and detect the genetic diversity of *lactobacilli* species isolated from different sources in Iran.

Materials & Methods: Twenty strains were isolated from Iranian traditional yoghurt, cheese, and Tarkhineh. PCR-mediated amplification was carried out by degenerate primers. Sequencing was performed after purification of the PCR product. The REP-PCR fingerprinting by (GTG) 5 oligonucleotide primers was conducted for the discrimination and genotypic grouping of isolates.

Results: Isolates were deposited as novel stains of *lactobacillus casei*, *brevis*, *plantarum*, and *Entrococcus facium* in GenBank. Clustering methods were performed on molecular data by NTSYS software, which was also supported by PCO ordination plot. The REP-PCR profiles showed that the 20 isolates produced different banding patterns. In UPGMA dendrogram, three main clusters were formed.

Conclusion: According to our findings, ERP-PCR appeared to be a very practical method and highly sensitive in the discrimination of the *lactobacillus* species. The results of sequencing corresponded to the clustering in dendrogram.

Keywords: *Lactobacillus*, genetic relationship, (GTG) 5-PCR fingerprinting

*** Corresponding author: Tafvizi Farzaneh,** Department of Biology, Faculty of science, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 22352253
Email: tafvizi@piau.ac.ir