تاثیر نوع میکرو فیلتر در تشخیص کلی فرم از آب آشامیدنی با استفاده از روش PCR

محمدجواد قناد زاده [1]، حمید ابطحی [2*]، علی هاتف سلمانیان [3]، احسان غزنوی راد [2]، مسعوده کریمی [2]

1) گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اراک
2) گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک
3) پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فن آوری

تاریخ دریافت: 87/7/8 تاریخ پذیرش: 88/4/15

چکیده

مقدمه: استفاده از روش های معمول تشخیص عوامل میکروبی آب اغلب با حساسیت کم و مستلزم صرف وقت زیادی می باشند. از مزایای روش های مولکولی از جمله PCR بالا بودن حساسیت، دقت، سرعت و هزینه نسبتا پایین آن است. برای انجام آزمایش PCR جهت تشخیص آلودگی آب به E.coli لازم است از روش تغلیظ نمونه ها با میکرو فیلتر استفاده شود. در این تحقیق سعی شده با بررسی دو نوع میکرو فیلتر نقش آن ها را در کارآیی PCR تعیین شود.

مواد و روش ها : رقت های 100/ 8 ، 4/100 ، 2/100 ، 1/100 ، 1/200 ، 1/400 ، 1/800 ، 1/1600 ، از باکتری در آب مقطر تهیه و به روش فیلتراسیون با دو نوع فیلتر FHLP و HAWP باکتری از نمونه جدا گردید. سپس تکثیر ژن ۱۶sRNA با استفاده از روش PCR و به کمک پرایمرهای طراحی شده انجام گرفت.

یافته های پژوهش: کشت رقت های تهیه شده نشان دهنده تأیید تعداد باکتری ها در این رقت ها بود. نتیجه PCR رقت ها پس از فیلتراسیون نشان داد که فیلترهایFHLP توانایی بالاتری نسبت به فیلترهای HAWP در جدا سازی باکتری ها دارند. چنانچه در رقت های پایین باکتری نتیجه PCR مثبت بود.

بحث و نتیجه گیری: نتایج به دست آمده از این بررسی حاکی از آن است که فیلترهای هیدروفوبیک (نظیر FHLP) قدرت بیشتری از فیلترهای هیدروفیلیک در جذب باکتری ها دارند. لذا استفاده از فیلترهای هیدروفیلیک در تشخیص باکتری با استفاده از روش های حساسی نظیر PCR اغلب باعث بروز نتایج منفی کاذب می شود.

واژه های کلیدی: کلی فرم، واکنش زنجیره ای پلیمرآز، میکروفیلتر

***نویسنده مسئول:** گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

E-mail: h_abtahi۲@yahoo.co.uk

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:02 IRST on Friday March 5th 2021

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:02 IRST on Friday March 5th 2021

مقدمه

یکی از مهمترین معضلات بهداشتی آب وجود عوامل بیماری زا در آن می باشد. شناسایی این عوامل و حذف آن ها از مسایل مهم بهـــداشتی آب به شمـــار می آیند. در روش های تشخیصی از باکتری اشریشیاکلی به عنوان نشـــانگر برای بررسی آلودگی آب به مـــدفوع و فـــاضلاب استفاده می گردد. روش های معمول برای شناسایی عوامل بیماری زا در آب علاوه بر اینکـــه وقت گیر و پرهزینه هستند، دقیق نیز نمی باشند،(1). به همیـــن علت بـــرای شنـــاســـایی وجـــود عوامل بیماری زا در آب روش هـــای جدیـــدی در دست مطالعه است. واکنـــش زنجیـــره ای پلیمرآزی(Polymerase Chain Reaction =PCR) از جمله روش هایی است که می تواند جایگزین مناسبی برای آزمایشات رایج باشد. روش اخیر حســاس، دقیق، ارزان و ســـریع می باشد. کارآیی استفاده از PCR در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است. با استفاده از روش فوق می توان تا حتی یک بـــاکتری در 100 مبلی لیتر آب را شناسایی نمود،(2). برای آزمـــایش میکـــروبی آب در حجم های بالا به روش PCR لازم است تا عمل تغلیظ آب صورت پذیرد. لذا برای این منظور از میکـــرو فیلترهای با منافذ ریز(در حد 0/42 میکرومتر) استفـــاده می شود. این مـــرحله نقش مهـــمی در جـــدا سازی بـــاکتری از آب دارد. مطالعـــات و آزمایشـــات نشان می دهد فیلتر های متفاوت، کارائی مختلف در جـــداسازی بـــاکتری ها داشته که در ســـرعت و نتـــایج آزمایش PCR نقـــش بسیار موثری دارد،(3). در این تحقیق دو نـــوع فیلتر هیـــدروفیلیک HAWP و هیـــدروفوبیـــک FHLP در آب برای جداسازی باکتری E.coli استفاده شده و نقـــش آن هـــا در نتیجه واکنش PCR مورد مقـــایسه قرار گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه یک مطالعه تجربی است. باکتری مورد استفاده در این تحقیق شامل اشریشیا کلی سویه DH۵α(تهیه شده از مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی) می باشد. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک(Merck) و مواد استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلیمرآز از شرکت سیناژن تهیه گردید. در این تحقیق نظیر اغلب مطالعات انجام شده از ژن ۱۶s rRNA به عنوان مولکول هدف برای شناسایی باکتری استفاده شده است. علت انتخاب این ژن، بالا بودن تعداد کپی این مولکول و پایداری آن در سلول می باشد.(4-5)

با استفاده از ترادف استاندارد ژن ۱۶srRNA (شماره دسترسی :EF۶۲۰۹۲۵) از باکتری اشریشیاکلی، طراحی پرایمرهای رفت(Forward) و برگشت (Reverse) انجام شد. ترادف پرایمرهای مزبور به صورت زیر است:

Forward: ۵" CGA GTG GCG GAC GGG TGA GT (FROM ۸۱)

Reverse: ۵" TCG ACA TCG TTT ACG GCG TGG A (FROM ۷۸۶)

پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت فرآیند دانش آرین(نماینده شرکت MWG آلمان در ایران) ساخته شد. ابتدا رقت های متوالی از سلول باکتری اشریشیاکلی در 100 میلی لیتر آب استریل تهیه گردید. برای تهیه رقت های باکتری از محلول شمـــاره یک مک فارلند استفاده گردید. برای این منظور ابتدا سوسپانسیون نظیر محلول شماره 1 مک فارلند از باکتری تهیه شد. سپس از این سوسپانسیون رقت های متوالی تهیه گردید. رقت های 8/100 تا 1/1600 از سوسپانسیون های بالا تهیه گردید. برای تائید صحت رقت های باکتری تهیه شده از کشت یک میلی لیتر هر رقت باکتری در محیط نوترینت آگار به صورت پور پلیت(Pour Plate) استفاده شد. رقت های تهیه شده طبق جدول شماره 1 در دو سری تهیه گردید.

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:02 IRST on Friday March 5th 2021

جدول 1. رقت های تهیه شده از کلی فرم

رقت	1/1600	1/800	1/400	1/200	1/100	2/100	4/100	8/100
تعداد باکتری	1	1	1	1	1	2	4	8
حجم آب(میلی لیتر)	1600	800	400	200	100	100	100	100

یک سری از رقت ها از فیلتر FHLP (شرکت میلی پور با قطر 0/5 میکرون) و سری دوم از فیلتر HAWP (شرکت میلی پور با قطر 0/45 میکرون) عبور داده شدند. سپس در شرایط استریل فیلترها در داخل میکروتیوب 0/5 قرار گرفت. 50 میکرولیتر از آب حاوی یک دهم درصد دی اتیل پیروکربنات (DEPC water) اتوکلاو شده به میکروتیوب افزوده گردید. سپس میکروتیوب ها با شدت ورتکس گردید تا سلول باکتری ها از سطح فیلتر به مایع داخل میکروتیوب رها شود.

غلظت عوامل PCR به شرح زیر استفاده گردید:

یک میلی مولار از پرایمرهای بالا ، 2/5 میلی مولار از یون منیزیوم، 200 میکرومولار از هر دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات، 2/5 واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase و بافر PCR با غلظت ۱X است. حجم نهایی مخلوط PCR با آب مقطر استریل به 100 میکرولیتر رسید.

برای تخریب کامل سلول باکتری قبل از شروع برنامه مخلوط PCR به مدت 10 دقیقه در حرارت 95 درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از آن برنامه زیر استفاده گردید:

مرحله اول PCR متشکل از سی و پنج چرخه که هر یک از سه قسمت تشکیل شده است. قسمت اول دناتورکردن(94 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت دوم برای اتصال پرایمرها به DNA الگو(59 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه)، قسمت سوم جهت تکثیر ژن هدف(72 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه) است. در نهایت مرحله تکثیر نهایی در 72 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه و برای یک چرخه است.

برای تائید صحت ترادف نوکلئوتید ژن به دست آمده از روش Nested PCR استفاده گردید. برای این منظور ترادف جدیدی از پرایمر رفت طراحی گردید. انجام واکنش زنجیره ای پلیمرآز با استفاده از پرایمر رفت جدید و پرایمر برگشت قبلی صورت گرفت. در نتیجه قطعه ژن بدست آمده باید در حدود 360 bp باشد.

Forward (Nested Primer): ٥' CGT TGG TAT CAA AGA GAC TCA GAA ٣' (From ٤١٨)

Reverse: ٥" TCG ACA TCG TTT ACG GCG TGG A (FROM ٧٨٦)

سپس برای تکثیر قطعه جدید از برنامه قبل با این تفاوت که دمای اتصال پرایمرها به DNA الگو(annealing) 59 درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه برنا مه ریزی شد.

برای بررسی نهایی محصولات PCR ، الکتروفورز آن بر روی ژل آگارز 1 درصد در بافر تریس بازی-اسید بوریک- EDTA (TBE با pH : 8) انجام گرفت. بررسی نتیجه الکتروفورز با استفاده از رنگ آمیزی آن با محلول اتیدیوم بروماید و مشاهده آن با دستگاه ترانس لومیناتور UV انجام گرفت.

یافته های پژوهش

با تکثیر ژن مورد نظر با استفاده از پرایمر های طراحی شده قطعه ای حدود 723 bp به دست آمد. کشت رقت های تهیه شده نشان دهنده در محیط کشت نوترین آگار به روش پور پلیت تعداد باکتری ها در این تایید رقت های نمود. نتیجه بررسی Nested PCR دال بر تایید ژن به دست آمده(srRNA ١٦) می باشد. همان گونه که در شکل شماره 1 آمده، قطعه 360 باز بر اساس استفاده از پرایمرNested Primer و پرایمر برگشت پس از PCR دیده شد. نتایج PCR نشان داد که فیلترهای FHLP،(شکل2). نسبت به فیلترهای HAWP،(شکل3). توانائی بیشتری در جذب باکتری ها دارند. نتیجه PCR همه رقت های عبور داده شده از فیلتر FHLP دارای باند بود، در عین حال

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:02 IRST on Friday March 5th 2021

نتیجه PCR رقت های بالاتر از 1/100 که از فیلتر HAWP عبور داده شده ، دارای باند است.

بحث و نتیجه گیری

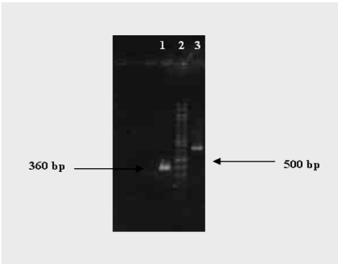
روش واکنش پلی مرآز زنجیره ای (Polymerase Chain Reaction= PCR) تکنیکی حساس و دقیق بوده که با استفاده از آن نه تنها آلودگی مشخص می گردد بلکه نوع باکتری را نیز می توان تعیین نمود،(5). در این روش با تخلیص کروموزوم باکتری و تکثیر آن با پرایمر های اختصاصی جنس و گونه وجود باکتری در نمونه بررسی می گردد.(6)

برای استفاده از روش های مولکولی از جمله PCR در تشخیص عوامل عفونی تغلیظ حجم های بالای آب است. برای این منظور معمولا از میکروفیلترها با منافذ ریز(بین 0/42 تا 0/5 میکرومتر) استفاده می گردد. تغلیظ نمونه ها با استفاده از این فیلترها باعث شناسایی باکتری ها حتی در حد یک باکتری می شود. از جمله فیلترهایی که استفاده وسیعی در این زمینه دارند، فیلترهای استات سلولز و یا پلی کربنات می باشد،(8). مطالعات مختلف نشان می دهد که استفاده ازاین فیلترها به علت اثر مهاری بر واکنش PCR، باعث بروز نتایج منفی کاذب می گردد. بنابر این انتخاب نوع فیلتر می تواند در جداسازی باکتری و در نهایت در نتیجه آزمایش PCR نقش مهمی را داشته باشد.

به طور کلی فیلترهای ساخته شده توسط شرکت های مختلف را می توان به دو دسته هیروفیلیک(آبدوست) و هیدروفوبیک(آب گریز) تقسیم نمود. لذا در این تحقیق سعی گردیده تا با انتخاب دو نوع از فیلترهای بالا توانایی آن ها را در جدا سازی و جذب باکتری و نتیجه واکنش PCR مورد مقایسه قرار داد.

نتایج این تحقیق نشان می دهد که استفاده از فیلترهای هیدروفوبیک(نظیر FHLP) توانایی بالایی در جذب باکتری ها را دارند. همان طور که نتایج مربوط به PCR این فیلترها نشان می دهد، حتی رقت های پایین این باکتری ها در صورتی که از این فیلترها عبور داده شوند توسط روش PCR قابل شناسایی است. جداسازی باکتری توسط این فیلترها می تواند باعث افزایش حساسیت روش PCR در تعیین و شناسایی باکتری گردد. علت ایجاد این افزایش حساسیت به واسطه از دست ندادن باکتری و در نتیجه قالب DNA می باشد. در عین حال استفاده از فیلترهای هیدروفیلیک (نظیر HAWP) با وجود این که قطر منافذ آن کمتر از فیلترهای FHLP است، قدرت کمتری را در جذب باکتری نشان می دهد. بنابر این به علت با از دست دادن باکتری و در نتیجه حذف قالب DNA، حساسیت PCR کاهش می یابد. فیلترهای HAWP تنها قادر به جدا سازی باکتری ها در رقت های بالاتر از چهار باکتری در یکصد میلی لیتر آب است. به عبارت دیگر با استفاده از این فیلترها شناسایی باکتری ها در رقت های پایین تر از چهار باکتری توسط روش PCR قابل استفاده نمی باشد.

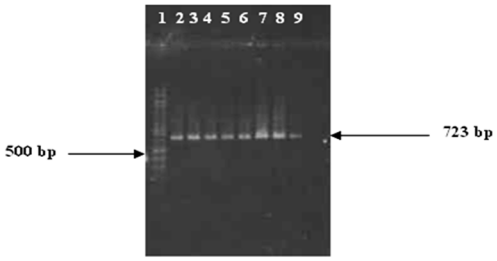
بنابر این با استفاده از فیلترهای هیدروفوبیک می توان حجم های نسبتا بالای آب آشامیدنی با رقت های پایین باکتری را با استفاده از روش های مولکولی از نظر وجود باکتری مورد بررسی قرار داد. این تحقیق با حمایت دانشگاه علوم پزشکی اراک و مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی اراک انجام گرفته است.



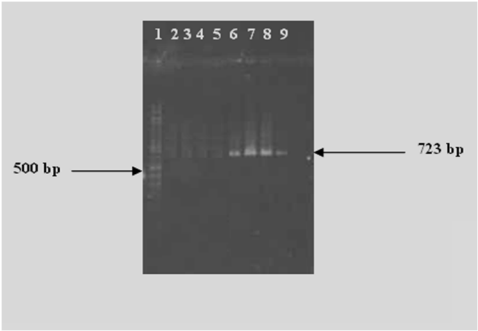
شکل 1 . نتیجه Nested PCR :

ردیف 1: محصول Nested PCR– **ردیف 2 : مارکر** BP **100** – **ردیف 3 : محصول** PCR **ژن** 16s rRNA

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:02 IRST on Friday March 5th 2021



شکل 2. نتیجه PCR رقت های باکتری فیلتر شده با FHLP –
ردیف 1: مارکر BP **100** – ردیف **2** : رقت **1/0 160** –ردیف **3** : **1/800** – ردیف **4** : **1/400**ردیف **5** : **1/200** – ردیف **6** : رقت **1/100** – ردیف **7** : رقت **2/100** –ردیف **8** : رقت **4/100** – ردیف **9** : رقت **8/100**



شکل 3. نتیجه PCR رقت های باکتری فیلتر شده باHAWP –
ردیف 1: مارکر BP **100** – ردیف **2** : رقت **1/0 160** –ردیف **3** : **1/800** – ردیف **4** : **1/400**ردیف **5** : **1/200** – ردیف **6** : رقت **1/100** – ردیف **7** : رقت **2/100** –ردیف **8** : رقت **4/100** – ردیف **9** : رقت **8/100**

References

۱-Toze S. PCR and the detection of microbial pathogens in water and waste water. Wat Res ۱۹۹۹; ۳۳(۱۷): ۳۵٤۵- ۵٦.

۲-Gary WP. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. Clinical Infectious Diseases ۲۰۰۷; ٤۵: S ۹۹–S ۱۱۱.

۳-Marc V, Francois G, Pierre B. Direct detection of viable bacteria, molds, and yeasts by reverse transcriptase PCR in contaminated milk samples after heat treatment.Appl Environ Microbial ۱۹۹۸; ٦٤ (۳): ۱۱۵۷–٦۰.

٤-Iqbal S, Deere RD. Saundera Jr, Porter J. Efficiency of the polymerase chain reaction amplification of the gene for detection of escherichia coli in contaminated water. Lett Appl Microb ۱۹۹۷; ۲٤: ٤۹۸- ۵۰۲.

۵-Horáková K, Mlejnková H, Mlejnek P. Direct detection of bacterial fecal indicators in water samples using PCR.Water Sci Technol. ۲۰۰٦; ۵٤(۳):۱۳۵-٤۰.

٦-Sabat G, Rose P, Hickey JW, Harkin JM. Selective and sensitive for PCR amplification of escherichia coli ۱٦S rRNA genes in soil. Appl Environ Microb ۲۰۰۰; ٦٦(۲): ۸٤٤- ۹.

۷-Katsuji T, Ken K, and Masao. Development of a direct in situ PCR method for detection of specific bacteria in natural environments. Appl Environ Microbial ۱۹۹۸; ٦٤(٤): ۱۵۳٦–٤۰.

۸-Yanming L, Ainslie G, Jing Z , Xing F. Detection of viable but nonculturable escherichia coli O۱۵۷:H۷ bacteria in drinking water and river water. Appl Environ Microbial ۲۰۰۸; ۷٤(۵): ۱۵۰۲–۷.

Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir at 17:02 IRST on Friday March 5th 2021

Effects of Micro-filter in Detection of Coliform in Tap Water by PCR

Ghannadzadeh MJ [1], Abtahi H [2], SalmanianAH[3], Ghaznavi Rad E [2], Karimi M[2]*

(Received:29 Sep, 2008 Accepted:6 Jul, 2009)

Abstract

Introduction: For detection of E.coli in top water by PCR, the samples must be concentrated by filter. In this study, we investigated two kinds of micro filters in PCR results.

Materials & Methods: After preparing dilution of E.coli (8/100, 4/100, 2/100, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 and 1/1600) in D.W, the bacteria were separated by FHLP and HAWP filters and 16s rRNA was propagated by the above- mentioned primers.

Findings: The rate of bacteria in dilutions was confirmed by culture. The PCR data showed that FHLP, better than HAWP filter, would be able to separate the bacteria in such dilutions after filtration.

Discussion & Conclusion: The results of this study showed that hydrophobic filter (FHLP) has a higher ability than that of hydrophilic filter (HAWP) in separating bacteria. So, successful PCR amplifications were achieved by cells concentrated with hydrophobic filters for detection of all the coliform bacteria, while false negative results decreased considerably.

Key word: coliform, PCR, microfilter

1. *Dept of Environmental Health, Health School, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran*

2. *Dept of Microbiology and Immunology, Medical and Molecular Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran*

3. *National Research Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran*

**(corresponding author)*