



Scan online to view this article

Design and production of a genetically simulant construct for the detection of *B. mallei* and *pseudomallei*

Mohammad javad dehghan esmatabadi*¹, Mahmood barati²,
Mohammad ali yaghobi moghaddam¹

1- Maleke Ashtar University, Tehran, Iran

2 Department of Medical Biotechnology, School of Allied Medical Sciences Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Aim and Background: the genus *Burkholderia* (*mallei* and *pseudomallei* species) are classified as dangerous human pathogens. Diagnosing cultures for this bacterium is costly and time consuming and on the other hand it is very dangerous to work with and it is very difficult to access this bacterium. the purpose of this research Design and production of a genetically simulant construct for the detection of *B. pseudomallei*

Material & Methods: initially, a simulant construct containing the reference and specific genes of the *mallei* and *pseudomallei* species was not observed in other species of the family, and then the operational efficiency of the designed construct was quantified using Real-Time Quantitative PCR. Quality (SYBER Green) and qualitative (using TaqMan probe) were evaluated. Finally, Real-Time PCR amplification products were analyzed by melting curve and electrophoresis.

Results: the minimum and maximum sensitivity were 0.1 pg and 10 ng on the constructs designed in the present study, was obtained.

Conclusion: This simulant can be used as a positive control for the detection of the *Burkholderia* agent and can further enhance the development of new diagnostic kits in the field.

Keywords: pathogens, *Burkholderia*, Real Time PCR, cloning, SYBR Green

Corresponding author:

Maleke Ashtar University, Tehran, Iran

Email: mohammad_dehghan@mut.ac.ir



طراحی و ساخت سازه شبیه ساز جهت تشخیص باکتری بورخولدريا مائى و سودومالئى

محمدجواد دهقان عصمت آبادی^{۱*}، محمود براتی^۲، محمدعلی یعقوبی مقدم^۱

۱- مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
۲- گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: باکتری های بورخولدريا مائى و سودومالئى (*Burkholderia mallei and pseudomallei* species) جزء عوامل بیماری زای خطرناک انسانی محسوب می شوند. تشخیص برپایه کشت برای این باکتری، هزینه بر و زمان بر و از طرف دیگر کار با این باکتری بسیار خطرناک بوده و هم چنین امکان دسترسی به این باکتری و حتی ژنوم آن بسیار مشکل است. هدف از انجام این مطالعه طراحی و سنتز کنترل مثبتی ایمن و کارآمد برای تشخیص باکتری بورخولدريا است.

مواد و روش ها: در ابتدا، یک سازه شبیه ساز که، حاوی ژن های مرجع و اختصاصی باکتری بورخولدريا مائى و سودومالئى است و در دیگر گونه های خانواده مشاهده نمی شود ساخته شد و سپس کارایی عملیاتی سازه طراحی شده، با استفاده از روش PCR Real-Time کمی (با استفاده از رنگ SYBER Green) و کیفی (با استفاده از پروب TaqMan)، مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت محصول های تکثیرى PCR Real-Time با استفاده از منحنی ذوب و الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: میزان حداقل و حداکثر حساسیت به ترتیب ۰/۱ پیکوگرم و ۱۰ نانوگرم بر روی سازه طراحی شده در مطالعه حاضر، حاصل شد.

نتیجه گیری: این سازه شبیه ساز می تواند به عنوان کنترل مثبت مناسبی، جهت تشخیص عامل بورخولدريا مورد استفاده قرار گیرد و هم چنین می تواند در آینده باعث پیشرفت هر چه بیشتر کیت های تشخیصی جدید در این حوزه بشود.

واژه های کلیدی: پاتوژن ها، بورخولدريا، Real Time PCR، کلونینگ، SYBER Green

مقدمه

به طور عمومی وکتورها و یا در فارسی حامل های ژنتیکی، ابزاری هایی مهندسی شده و مصنوعی هستند که در

کلونینگ مولکولی مورد استفاده قرار می گیرند. به طور عمومی حامل ژنتیکی، ابزاری برای انتقال، تکثیر و یا بیان یک قطعه ژنتیکی در یک یا چند میزبان خاص هستند (۱،۲). قابلیت ویژه این چنین حامل ژنتیکی در حمل قطعه ژنتیکی، این فکر را به ذهن خطور می دهد که چرا از همین خصوصیت برای رفع نیازهای آزمایشگاهی مثل عدم وجود کنترل مثبت ژنتیکی مناسب برای بعضی از عوامل میکروبی و ویروسی خاص استفاده نکنیم. در واقع کاربرد یک توالی کنترل مثبت، به منظور تأیید حضور یک ارگانیسم خاص برای تأیید تشخیص دقیق و بدون خطای حضور آن

نویسنده مسئول:

مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر

پست الکترونیکی: mohammad_dehghan@mut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۴

یافت می‌شود. این باکتری، در مزارع برنج، عامل نوعی بیماری به‌نام ملیوئیدوزیس یا بیماری بمب ویتنام است. عفونت انسانی با بورخولدريا سودومالئی به‌طور معمولی با ورود باکتری از طریق زخم‌ها، بریدگی‌ها یا خراش‌ها آغاز می‌شود. به هر حال در بعضی از موارد، آلودگی از طریق تنفس باکتری توسط فرد سالم؛ یا در افراد بستری در بیمارستان از طریق وسایل برونکوسکوپي و اداری آلوده و یا کارکنان آزمایشگاه در حین کشت بورخولدريا سودومالئی، آغاز می‌شود (۱۹). از جمله روش‌های شناسایی این عامل بیماری‌زا (بورخولدريا سودومالئی، بورخولدريا مالئی) می‌توان به کشت در محیط‌های کشت استاندارد میکروبیولوژی اشاره کرد که، ایجاد کلنی‌های فشرده می‌کند. بورخولدريا سودومالئی رنگ را به‌صورت دو قطبی به خود گرفته و در زیر میکروسکوپ به شکل سنجاق قفلی دیده می‌شود (۱۷، ۱۹). قطعی‌ترین راه تشخیص هر بیماری، جداسازی عامل بیماری است. اما در این مسیر برای تشخیص عامل بیماری‌زا که، بر پایه کشت میکروارگانیزم بوده مشکلاتی از جمله: هزینه‌بر بودن، زمان‌بر بودن و خطرات کار با این عامل بیماری‌زا وجود دارد. بر همین اساس، امروزه روش‌های تشخیصی بر پایه PCR که، سریع‌تر و دقیق‌تر بوده، در حال رواج هستند (۲۰-۲۲). در این بین، روش‌های Real-Time PCR برای تشخیص مستقیم گونه‌های بورخولدريا در نمونه‌های بالینی، در حال افزایش است (۲۳). تکنیک Real-Time PCR نیز یک تکنیک بسیار دقیق تشخیصی در زیرمجموعه روش‌های PCR است. در این تکنیک می‌توان مقدار کمی از ماده اولیه یک نمونه الگو را به‌صورتی بسیار اختصاصی، حساس و با قابلیت تکرار بالا، اندازه گرفت (۲۴، ۲۵). روش Real-Time PCR می‌تواند به‌طور مختلف و با رویکردهای مختلف جهت انجام آزمون‌هایی با اهداف خاص انجام شود. در این مطالعه، بعد از طراحی و سنتز سازه کنترل مثبت موردنظر، پرایمرها و پروب مربوطه، کارایی سازه موردنظر با استفاده از روش‌های Real-Time PCR کمی (با استفاده از رنگ Green SYBER) و کیفی (با استفاده از پروب TaqMan)، مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان حساسیت و اختصاصیت پرایمرها و پروب مربوطه، بررسی شد. هدف از این مطالعه طراحی و سنتز سازه‌های

میکروارگانیزم خاص در یک نمونه آزمایشگاهی است. در یک مطالعه که در کشور فرانسه انجام پذیرفت از این نوع حامل ژنتیکی، به‌عنوان یک کنترل مثبت برای عواملی از جمله: عامل ویروس واریولا^۱، ریکتزیا آکاری^۲، ویروس آبله میمونی^۳، ویروس ارتو پاکس^۴، ویروس واریسلا زوستر^۵ و ویروس هرپس سیمپلکس^۶ استفاده شد (۳). از دیگر مطالعه‌های انجام شده در این حوزه می‌توان به ۲ ثبت اختراع مقاله در آمریکا اشاره کرد. در واقع هدف اصلی این گروه‌های تحقیقاتی فراهم‌آوری نوعی کنترل مثبت با هدف غلبه بر مشکلات عدیده‌ای مثل ۱- فقدان ژنوم عوامل پرخطر به‌منظور کالیبره کردن تکنیک‌ها و استفاده به‌عنوان کنترل مثبت، ۲- رخداد نتایج مثبت کاذب، ۳- محدودیت دسترسی به تست‌های تجاری موجود، به‌منظور تشخیص عامل بورخولدريا و .. است (۹-۴). نام بورخولدريا (سابق بخشی از سودوموناس‌ها خوانده می‌شدند) به گروهی از باکتری‌ها گفته می‌شود که همواره در همه‌جا، گرم منفی، متحرک، به اجبار هوازی و میله‌ای شکل هستند. نکته مهم، مقاومت به آنتی‌بیوتیک است که در این گونه‌ها دیده می‌شود (۱۳-۱۰). بورخولدريا مالئی عامل بیماری مشمشه است. این بیماری بسیار کشنده، بیش‌تر در اسب‌ها دیده شده و از بیماری‌های مشترک انسان و دام است. عامل بیماری، باکتری گرم منفی غیرمتحرک، فاقد کپسول و بدون اسپور به نام سودوموناس مالئی است که گاهی بورخولدريا مالئی نیز نامیده می‌شود. دارای ژنوم دوکروموزومی حلقوی به‌طول ۳/۵ مگاباز است که کروموزوم ۱ ژن‌های مربوط به سنتز دیواره، متابولیسم و بیوسنتز لیپوپلی‌ساکاریدها را حمل می‌کند و کروموزوم ۲ ژن‌های مربوط به آلودگی ویروسی را در بر دارد. این باکتری هم‌چنین شامل یک مگا پلاسمید ۲/۳ مگابازی نیز است (۱۸-۱۴، ۱۰). بورخولدريا (سودوموناس) سودومالئی یا باسیل ویت - موریس یک باکتری آزادی است که در آب‌های گرم و خاک مرطوب جنوب شرقی آسیا

¹ Variolla Virus

² Rickettsia akari

³ Monkeypox virus

⁴ Orthopoxvirus

⁵ Varicella zoster virus

⁶ Herpes simplex virus

شبهه ساز به عنوان کنترل مثبت جهت تشخیص گونه بورخولدريا است.

مواد و روش ها

۱- طراحی و تولید سازه شبهه ساز، پرایمرها و پروب- های مورد نیاز:

الف: تمامی توالی های نوکلئوتیدی از هر کدام از گونه های بورخولدريا مالئی، بورخولدريا سودومالئی مورد نظر این پروژه که در بانک داده ای عمومی و مرجع INSDC (مجموعه بانک های داده ای NCBI, DDBJ و EMBL-EBI) وجود داشت به صورت کامل در قالب فایل با فرمت FASTA استخراج و گردآوری شد. سپس تمامی خروجی های نوکلئوتیدی آزمون BLAST-N در سایت NCBI (با انتخاب بانک داده ای NR) برای توالی های هدف منتخب (که بیش تر شامل ۱۰۰ توالی می شود) در قالب فایل با فرمت FASTA گردآوری شدند و به دلیل این که توالی هایی که از بانک داده ای عمومی و مرجع INSDC استخراج شده بودند (به ویژه در مورد توالی های باکتریایی) بیش تر بسیار بلند هستند و به طور عملی فرآیند هم ردیفی چندگانه برای آنها با امکانات موجود در ایران بسیار دشوار است در نتیجه، سعی شد تا توالی های کوتاه (بیش تر زیر ۲ کیلوباز) برای ژن های منتخب، از میان مجموعه توالی های نوکلئوتیدی یک عامل بیماری زای خاص، از بانک داده ای فوق الذکر، استخراج شود؛ تا بتوان در مواردی که حجم و طول توالی ها زیاد است از این فایل جدید در فرآیند هم ردیفی چندگانه و پیدا کردن نواحی منتخب حفاظت شده در آن عامل بیماری زای خاص، استفاده کرد. در گام بعد، به وسیله حداقل ۳ نرم افزار قدرتمند در فرآیندهای آنالیز توالی، هم ردیفی چندگانه و ... به نام های MEGA, AliView و BioEdit و چندین سرور آنلاین معروف در این حوزه مثل Clustal W و ... تمامی این توالی های استخراج شده، مورد ارزیابی قرار گرفت و نواحی حفاظت شده تا حد ممکن شناسایی شد (لازم به ذکر است، بیش تر بر روی نواحی منتخبی که در مقاله هایی به آنها استناد شده بود متمرکز شدیم). پس از این مرحله، یک ناحیه توالی حفاظت شده با طول واقعی ۱۷۷ جفت باز برای ساخت یک سازه شبهه ساز مورد استفاده قرار گرفته و

در داخل پلاسمید pUC57 کلون شده (طول سازه پس از طراحی که در قسمت بعد ذکر می شود، ۱۹۷ جفت باز شد) و سپس با فرآیند ترانسفورماسیون وارد باکتری *E. coli* مستعد DH5 α شدند (شکل ۱). بعد از کشت شبانه باکتری ها در محیط کشت LB، در دمای ۳۷ درجه سانتی- گراد انکوبه شده، سپس پلاسمید توسط کیت استخراج پلاسمید GeneAll® Exprep™ Plasmid SV mini مورد استفاده قرار گرفت.

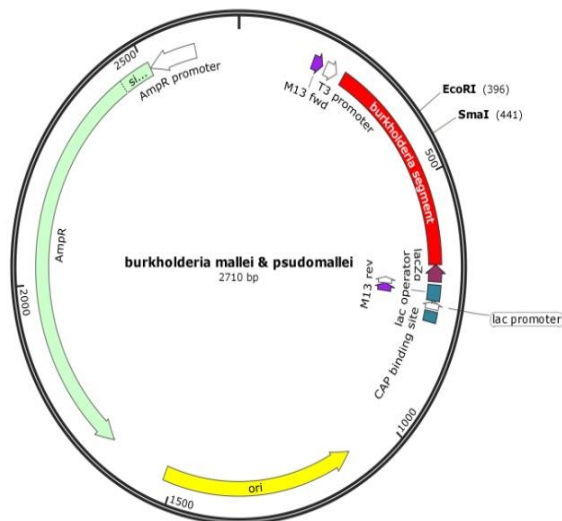
ب: تغییرهای خاص ناحیه ژنی هدف به منظور قرار گیری در سازه: پس از طراحی پرایمرها برای ناحیه اختصاصی که هم در سازه و هم در عامل اصلی ایجاد بیماری، به طور کامل اختصاصی متصل می شوند کار مهم دیگری که انجام گرفت؛ اضافه کردن یک ناحیه در وسط قطعه مورد نظر در سازه، بود که این عمل باعث بلند شدن قطعه مورد نظر در سازه نسبت- به قطعه اصلی موجود در عامل می شود و تشخیص آن را نسبت به عامل اصلی، دقیق تر می سازد. کار دیگر انجام گرفته این است که، در وسط قطعه مذکور موجود در سازه، ناحیه ای برای برش آنزیمی قرار گرفت که شامل ناحیه برش آنزیمی EcoRI –GAATTC– and SmaI –) SmaI و EcoRI –CCCGGG– بود. این نواحی به این منظور در میان ناحیه هدف قرار گرفت که ۱- هنگام انجام آزمایش و بعد از انجام واکنش PCR، با اعمال این آنزیمها بر روی محصولات تکثیری حاصل از سازه و ژنوم نمونه مشکوک، با برش محصول تکثیری حاصل از سازه توسط این دو آنزیم، محصولات تکثیری سازه و ژنوم نمونه مشکوک بر روی ژل قابل تمایز باشند و ۲- با اعمال پیش تیمار این آنزیمها بر روی نمونه مشکوک، از برش خوردن و عدم تکثیر سازه مصنوعی که شاید به دلیل آلودگی های آزمایشگاهی وارد نمونه مشکوک شده باشد، قبل از آزمون PCR، اطمینان حاصل شود. در واقع این اعمال باز هم به منظور کاهش خطا و حذف نتایج مثبت کاذب است (شکل ۱).

ج: پروبها و پرایمرها با استفاده از نرم افزار طراحی پرایمر AllelID، به طور اختصاصی براساس ناحیه rRNA-16S ribosomal RNA که توسط ژن لوکوس MH006571 کد

بیشتر پرایمرها و پروب‌های طراحی شده برای ناحیه مورد نظر است.

می‌شود (قسمتی از ناحیه حفاظت شده منتخب) طراحی و سنتز شدند (جدول ۱). تفاوت این مطالعه به اختصاصیت

شکل ۱- تصویر شماتیک طراحی شده از سازه که نشان دهنده توالی برش برای آنزیم‌های محدود کننده است.



جدول ۱- فهرست پرایمرها و پروب‌هایی که به صورت مشترک بین هر ۲ گونه طراحی شده است تا با یک جفت پرایمر و پروب بتوان هر ۲ گونه را یکجا، شناسایی کرد.

اندازه قطعه تکثیری واقعی	طول	توالی پرایمرها و پروب مورد نظر	توالی هدف	ارگانسیم هدف
۱۷۷ جفت باز	۲۱	TTCTGGCTAATACCCGGACTG	rRNA-16S ribosomalRNA gene	بورخولدریا مالمی و سودومالنی
	۱۸	CAGTTCACGTTGAGCC		
	۲۵	FAM-CGCACGCTTTACGCCAGTAATTC-BHQ1		

۲- انجام آزمون Real-Time PCR

۲-۱- استفاده از روش کیفی با استفاده از رنگ

SYBR Green

با استفاده از Real-Time PCR کمی موارد زیر مورد بررسی قرار گرفت الف: بررسی این‌که آیا این واکنش صورت می‌پذیرد و یا خیر (که در صورت تکثیر قطعه مورد نظر، به-طور قطع منحنی مربوط به آن در دستگاه Real-Time PCR قابل مشاهده است) و ب: این‌که آیا پیک منحنی ذوب هر محصول تکثیری به صورت منفرد است و یا خیر (که در صورت تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر، تنها یک پیک مشاهده می‌شود) و در نتیجه، بعد از این بررسی‌ها می‌توان

PCR در دستگاه Corbett Rotorgen 6000 صورت گرفت. تهیه مخلوط با اضافه کردن ۵ میکرولیتر SYBR Green، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط پرایمر پیشرو و پیرو (۱۰ pM)، مقدار متغیر (به صورت سریالی از غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ و ۱ نانوگرم بر میکرولیتر و ۱۰۰ و ۱۰ و ۱ پیکوگرم بر میکرولیتر و ۱۰۰ و ۱۰ و ۱ فمتوگرم بر میکرولیتر) پلاسمید pUC57، تا حجم ۱۰ میکرولیتر آب تزریقی به ازای هر نمونه در یک میکروتیوب استریل است. پس از اضافه نمودن میکس مربوط به چاهک‌های استریپ، رقت‌های مختلف پلاسمید pUC57 اضافه گردید و استریپ‌ها با کپ مخصوص پوشانده شد. سپس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه

Rotorgen 6000 قرار داده شد. سپس برای PCR برنامه Pre-denaturation: ۱۵ دقیقه، در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به تعداد یک سیکل، Denaturation: ۵ ثانیه، در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به تعداد ۴۰ سیکل، Annealing: ۲۵ ثانیه، در دمای ۶۲ درجه سانتی گراد به تعداد ۴۰ سیکل، Extension: ۳۰ ثانیه، در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به تعداد ۴۰ سیکل طراحی شد. کنترل مثبت واکنش خود سازه طراحی شده و کنترل منفی فاقد سازه بوده است.

۲-۲- استفاده از روش کیفی با استفاده از پروب TaqMan

با استفاده از Real-Time PCR کیفی موارد زیر مورد بررسی قرار گرفت. الف: بررسی این که آیا این واکنش صورت می پذیرد و یا خیر (که در صورت تکثیر قطعه مورد نظر، به طور قطع منحنی مربوط به آن در دستگاه Real-Time PCR قابل مشاهده است). ب: این که آیا باند تکثیری با طول مشخص مربوط به آن عامل بر روی ژل مشاهده می شود یا خیر. در نتیجه بعد از این بررسی ها می توان صحت واکنش را تأیید کرد. انجام واکنش Real-Time PCR در دستگاه Corbett Rotorgen 6000 صورت گرفت. تهیه مخلوط با اضافه کردن ۵ میکرولیتر مستر میکس TaqMan، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط پرایمر پیشرو و پیرو (pM)، ۰/۵ میکرولیتر پروب، مقدار متغیر (به صورت سریالی از غلظت های ۱۰۰ و ۱۰ و ۱ نانوگرم بر میکرولیتر و ۱۰۰ و ۱۰ و ۱ پیکوگرم بر میکرولیتر و ۱۰۰ و ۱۰ و ۱ فمتوگرم بر میکرولیتر) پلاسمید pUC57، تا حجم ۱۰ میکرولیتر آب تزریقی به ازای هر نمونه در یک میکروتیوب استریل. پس از اضافه نمودن میکس مربوط به چاهک های استریپ، رقت های مختلف پلاسمید pUC57 اضافه گردید و استریپ ها با کپ مخصوص پوشانده شد. سپس در ۱۰۰۰ دور بر دقیقه دستگاه، گریزانه شد و درون دستگاه Corbett Rotorgen 6000 قرار داده شد. سپس برای PCR برنامه

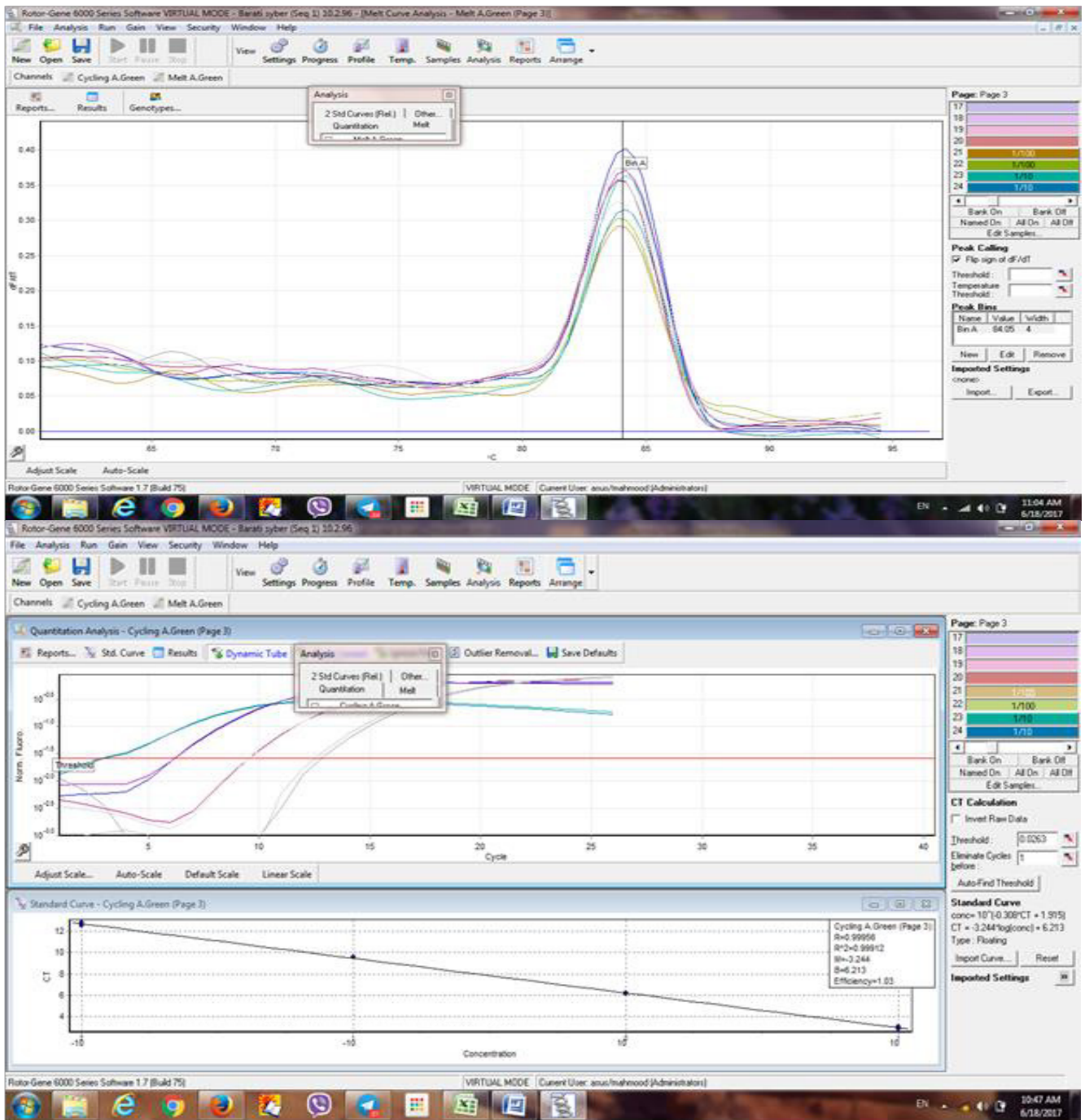
Pre-denaturation: ۱۰ دقیقه، در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به تعداد یک سیکل، denaturation: ۵ ثانیه، در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به تعداد ۴۰ سیکل، Extension/Annealing: ۳۰ ثانیه، در دمای ۶۲ درجه سانتی گراد به تعداد ۴۰ سیکل طراحی شد. در نهایت محصولات تکثیری بر روی ژل آگارز ۱ درصد برده شده (که در صورت تکثیر اختصاصی قطعه مورد نظر، تنها یک باند تکثیری بر روی ژل مشاهده می شود) و تصاویر حاصل از آن ها ذخیره شد. کنترل مثبت واکنش خود سازه طراحی شده و کنترل منفی فاقد سازه بوده است.

۲-۳- تحلیل آماری داده ها

آنالیز آماری داده های به دست آمده در این مطالعه براساس حداقل سه بار تکرار استوار است که، با گرفتن میانگین و محاسبه انحراف معیار، میزان تغییرها محاسبه شد. برای آزمون مقایسه ای بین میانگین گروه ها روش نان پارامتریک wilcoxon مورد استفاده قرار گرفت.

۳- نتایج

الف: آزمون Real-Time PCR با استفاده از رنگ SYBR Green در رقت های مختلف ۱۰۰ پیکوگرم، ۱۰ پیکوگرم، ۱ پیکوگرم و ۰/۱ پیکوگرم از پلاسمید مذکور (با ۲ تکرار)، صورت پذیرفت. منحنی های تکثیر و سریال غلظتی حاصله، نشان دادند که، با افزایش نسبت رقت پلاسمید مربوطه، به همان نسبت، اعداد سیکل آستانه ای (Ct) مشاهده شده نیز کاهش می یابد. هم چنین با مشاهده تک پیک بودن نتیجه حاصل از بررسی منحنی ذوب، تکثیر اختصاصی و انفرادی محصول مربوطه بر روی سازه اثبات گردید. تصاویر آزمون Real-Time PCR با استفاده از رنگ SYBR Green و منحنی سریال غلظتی و منحنی ذوب در شکل ۳ آورده شده است.

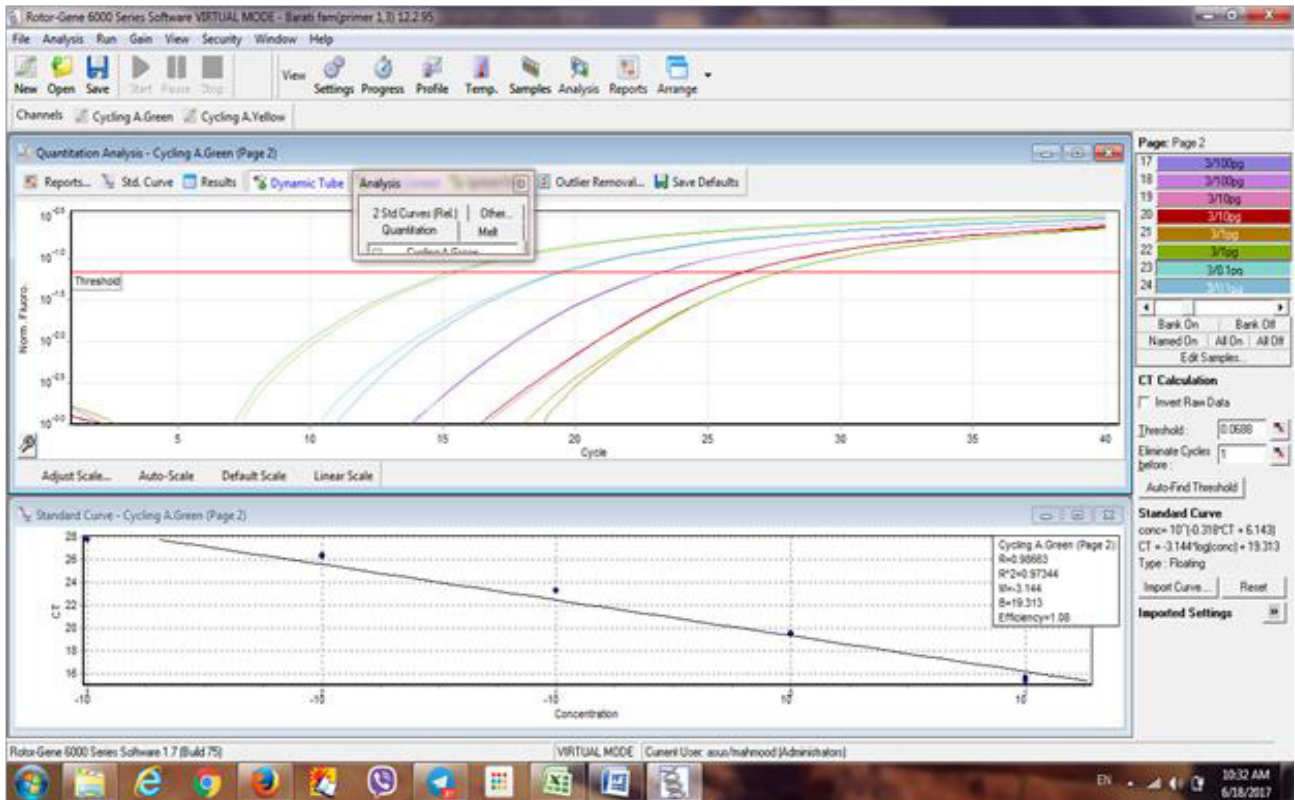


شکل ۳- روش Real-Time PCR با استفاده از رنگ SYBR Green در عامل بورخولدریا، نتیجه Real-Time PCR با دستگاه Corbett Rotorgen 6000 با استفاده از رنگ SYBR Green مربوط به واکنش پرایمر پیشرو و پیرو توالی بورخولدریا در غلظت و رقت‌های مختلف ۱۰۰ پیکوگرم، ۱۰ پیکونانوگرم، ۱ پیکوگرم و ۰/۱ پیکوگرم پلاسمید همراه نمودار standard curve و نمودار منحنی ذوب مربوطه نکته: هر واکنش به صورت دوگانه انجام شده است و هم‌چنین دارای نمونه کنترل منفی نیز است.

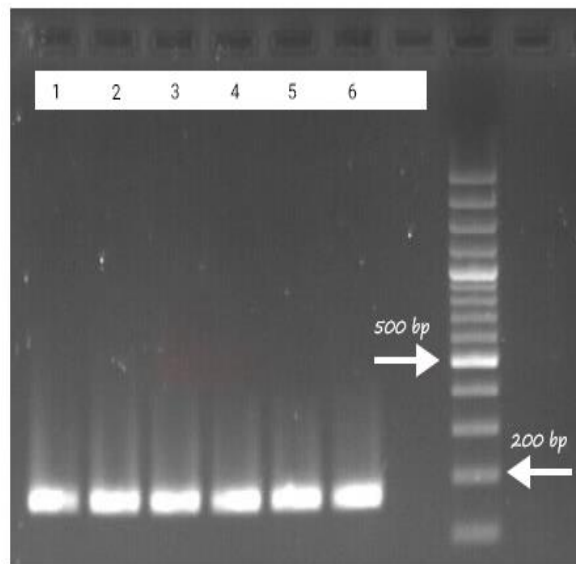
پلاسمید مربوطه، به همان نسبت، اعداد سیکل آستانه‌ای (Ct) مشاهده شده نیز کاهش می‌یابد. هم‌چنین با مشاهده تک باند بودن محصول حاصل از واکنش مربوطه بر روی ژل، تکثیر اختصاصی و انفرادی محصول مربوطه بر روی سازه اثبات گردید. تصاویر به ترتیب روش Real-Time PCR

ب: آزمون Real-Time PCR با استفاده از پروب TaqMan در رقت‌های مختلف ۱۰۰ نانوگرم، ۱ نانوگرم، ۱۰۰ پیکوگرم، ۱۰ پیکوگرم و ۱ پیکوگرم از پلاسمید مذکور (با ۲ تکرار)، صورت پذیرفت. منحنی‌های تکثیر و سریال غلظتی حاصله نشان دادند که، با افزایش نسبت رقت

TaqMan و منحنی سریال غلظتی و ژل مربوطه در شکل ۴ و ۵ آورده شده است.



شکل ۴- نتیجه Real-Time PCR با دستگاه Corbett Rotorgen 6000 با استفاده از روش TaqMan مربوط به واکنش پرایمر پیشرو و پیرو و پروب توالی بورخولدريا در غلظت و رقت های مختلف ۱۰۰ نانوگرم، ۱۰ پیکوگرم و ۱ پیکوگرم پلاسمید ۱ همراه نمودار standard curve نکته: هر واکنش به صورت دوگانه انجام شده است و همچنین دارای نمونه کنترل منفی نیز است



شکل ۵. ژل الکتروفورز آگارز ۱/۵ درصد توالی بورخولدريا در ساینز قطعه ۱۹۷ جفت باز
 1)NTC 2)10ng 3)1ng 4)100pg 5)10pg 6)1pg
 همان طور که مشاهده می شود تک باند در ناحیه ۲۰۰ جفت بازی قابل مشاهده هستند. ساینز قطعه ۱۹۷ جفت باز است.

سایر باکتری‌ها تفکیک می‌کند بلکه در خود جنس بورخولدريا نیز تمایز قائل شده و گونه مالئی را از سایرین تفکیک می‌کند (۳۶). نتیجه و روش‌های استفاده شده در این پروژه، تا حدود زیادی مشابه به دو تحقیق اصلی ذکر شده است که، خود نشان دهنده عملکرد صحیح ما در این پروژه است. همان‌طور که ذکر شد، تحقیقاتی زیادی در این زمینه و تولید این گونه سازه‌های شبیه‌ساز انجام نگرفته و امیدواریم این پژوهش، نوید بخش تحقیقات بیش‌تر در زمینه تولید کیت‌های تشخیصی این عامل و ایجاد روش‌های جدید برای تشخیص باشد.

نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج حاصل شده در مطالعه و همین‌طور بررسی مطالعه‌های پیشین در بخش بحث می‌تواند به این نتیجه رسید که، طراحی و ساخت سازه شبیه‌ساز و استفاده از آن در کیت‌های تشخیصی به‌عنوان یک کنترل مثبت می‌تواند، خطرناک ناشی از آلودگی به باکتری بیماری‌زا، نبود ژنوم عامل بیماری‌زا، حذف تجهیزات پیشرفته برای کار با عامل بیماری‌زا و... را سبب شده و به این ترتیب کمک شایانی به تحقیقات در این زمینه و همین‌طور در تشخیص این عوامل بیماری‌زا کند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری مؤثر کارکنان و دانشجویان پژوهشکده علوم و فناوری‌های زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر، بابت تمامی تلاش‌ها و کمک‌هایشان در حین انجام این پروژه، کمال تشکر و قدردانی می‌گردد. این مطالعه با حمایت‌های دانشگاه صنعتی مالک اشتر صورت پذیرفته است.

هدف از انجام این تحقیق، طراحی تولید سازه حامل مصنوعی جهت رسیدن به روشی جدید و مطمئن برای شناسایی سریع‌تر و دقیق‌تر عامل بورخولدريا و ایجاد کنترل مثبت مناسب و ایمن برای تشخیص این عامل بیماری‌زای خطرناک است. به دلیل این‌که مطالعه‌های مشابه‌ای بر روی سازه‌های این چینی به‌ندرت انجام شده است و بیش‌تر مطالعه‌ها بر روی خود باکتری هدف و یا ژنوم آن و نه سازه مصنوعی، صورت گرفته است در نتیجه، امکان مقایسه مشابه و برابر برای ما وجود ندارد. بر این اساس، تنها به ذکر حداقل و حداکثر حساسیت در مطالعه‌های پیشین و مطالعه خودمان بسنده می‌کنیم. حداقل و حداکثر حساسیت در مطالعه‌های پیشین که بر روی خود باکتری بورخولدريا صورت گرفته است، به ترتیب ۱ پیکوگرم و ۱ میکروگرم است (۲۶-۳۶). از سوی دیگر قابل ذکر است که، میزان حداقل و حداکثر حساسیت به‌دست آمده در مطالعه حاضر، به ترتیب ۰/۱ پیکوگرم و ۱۰ نانوگرم بر روی سازه طراحی شده است که به‌نظر می‌رسد مقدار مطلوبی است. از مطالعه‌های مشابه با پژوهش حاضر می‌توان به مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۴، در کشور فرانسه با استفاده از روش PCR مشاهده پیوسته واکنش تک گانه (با استفاده از پروب) برای ارزیابی پلاسمید کنترل مثبت و عامل بیماری‌زا و مطالعه آقای Erin P. Price و همکارانش در کشور آمریکا در سال ۲۰۱۲ اشاره کرد (۳،۳۶). در این مطالعه نیز مشابه تحقیق حاضر، فقط یک ناحیه خاصی حفاظت شده را که در تمامی جنس بورخولدريا وجود داشت، هدف قرار دادند؛ اما نکته مهم در نظر گرفته شده در این پژوهش نسبت به تحقیق حاضر این است که، به‌منظور تفکیک گونه بورخولدريا مالئی از سایرین، حضور یک پلی‌مورفیسم در یک ناحیه خاص که در گونه مالئی بسیار حائز اهمیت است را مدنظر قرار دادند و در نتیجه پروب‌های مورد استفاده به‌منظور تفکیک مالئی در همین ناحیه نسبت به سایر پروب‌های تشخیص دهنده سایر گونه‌های بورخولدريا، متفاوت هستند. نتیجه بسیار قابل قبول و رضایت‌بخش بود که نه تنها بورخولدريا مالئی را از

1. Brown TA. Gene cloning and DNA analysis: an introduction: John Wiley & Sons; 2016.
2. Kostylev M, Otwell AE, Richardson RE, Suzuki Y. Cloning Should Be Simple: Escherichia coli DH5alpha-Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. PloS one. 2015;10(9):e0137466. PubMed PMID: 26348330. Pubmed Central PMCID: 4562628.
3. Charrel RN, La Scola B, Raoult D. Multi-pathogens sequence containing plasmids as positive controls for universal detection of potential agents of bioterrorism. BMC Microbiol. 2004 May 17;4:21. PubMed PMID: 15147587. Pubmed Central PMCID: 425577.
4. Carrera M, Sagripanti JL. Non-infectious plasmid engineered to simulate multiple viral threat agents. J Virol Methods. 2009 Jul;159(1):29-33. PubMed PMID: 19442841.
5. Carrera M, Sagripanti JL. Artificial plasmid engineered to simulate multiple biological threat agents. Appl Microbiol Biotechnol. 2009 Jan;81(6):1129-39. PubMed PMID: 18923830.
6. Saxena A, Pal V, Tripathi NK, Goel AK. Development of a rapid and sensitive recombinase polymerase amplification-lateral flow assay for detection of Burkholderia mallei. Transboundary and emerging diseases. 2019 Mar;66(2):1016-22. PubMed PMID: 30650261.
7. Saxena A, Pal V, Tripathi NK, Goel AK. A real-time loop mediated isothermal amplification assay for molecular detection of Burkholderia mallei, the aetiological agent of a zoonotic and re-emerging disease glanders. Acta tropica. 2019 Jun;194:189-94. PubMed PMID: 30958991.
8. Shi L, Chen J, Yi G. Burkholderia pseudomallei was Identified in a Melioidosis Aneurysm using Polymerase Chain Reaction Targeting 23S rRNA. Annals of vascular surgery. 2020 Oct;68:569 e13- e20. PubMed PMID: 32339680.
9. Peng Y, Zheng X, Kan B, Li W, Zhang W, Jiang T, et al. Rapid detection of Burkholderia pseudomallei with a lateral flow recombinase polymerase amplification assay. PloS one. 2019;14(7):e0213416. PubMed PMID: 31283772. Pubmed Central PMCID: 6613700.
10. Estrada-de los Santos P, Vinuesa P, Martinez-Aguilar L, Hirsch AM, Caballero-Mellado J. Phylogenetic analysis of burkholderia species by multilocus sequence analysis. Current microbiology. 2013 Jul;67(1):51-60. PubMed PMID: 23404651.
11. Torres AG, Hall CM, Jaramillo S, Jimenez R, Stone NE, Centner H, et al. Burkholderia pseudomallei, the causative agent of melioidosis, is rare but ecologically established and widely dispersed in the environment in Puerto Rico. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2019;13(9):e0007727.
12. Khakhum N, Chapartegui-Gonzalez I, Torres AG. Combating the great mimicker: latest progress in the development of Burkholderia pseudomallei vaccines. Expert review of vaccines. 2020 Jul;19(7):653-60. PubMed PMID: 32669008.
13. Saiprom N, Sangsri T, Tandhavanant S, Sengyee S, Phunpang R, Preechanukul A, et al. Genomic loss in environmental and isogenic morphotype isolates of Burkholderia pseudomallei is associated with

intracellular survival and plaque-forming efficiency. PLoS Negl Trop Dis. 2020 Sep 29;14(9):e0008590. PubMed PMID: 32991584.

14. Whitlock GC, Estes DM, Torres AG. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. FEMS Microbiol Lett. 2007 Dec;277(2):115-22. PubMed PMID: 18031330.

15. Losada L, Ronning CM, DeShazer D, Woods D, Fedorova N, Kim HS, et al. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements. Genome Biol Evol. 2010 Jan 22;2:102-16. PubMed PMID: 20333227. Pubmed Central PMCID: 2839346.

16. Bondi SK, Goldberg JB. Strategies toward vaccines against *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. Expert review of vaccines. 2014;7(9):1357-65.

17. Moawad AA, Silge A, Bocklitz T, Fischer K, Rosch P, Roesler U, et al. A Machine Learning-Based Raman Spectroscopic Assay for the Identification of *Burkholderia mallei* and Related Species. Molecules. 2019 Dec 10;24(24). PubMed PMID: 31835527. Pubmed Central PMCID: 6943587.

18. Khakhum N, Tapia D, Torres AG. *Burkholderia mallei* and Glanders. In: Singh SK, Kuhn JH, editors. Defense Against Biological Attacks: Volume II. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 161-83.

19. Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. Clin Microbiol Rev. 2005 Apr;18(2):383-416. PubMed PMID: 15831829. Pubmed Central PMCID: 1082802.

20. Bauernfeind A, Roller C, Meyer D, Jungwirth R, Schneider I. Molecular Procedure for Rapid Detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. Journal of clinical microbiology. 1998;36(9):2737-41.

21. Larson DT, Schully KL, Spall A, Lawler JV, Maves RC. Indirect Detection of *Burkholderia pseudomallei* Infection in a US Marine After Training in Australia. Open forum infectious diseases. 2020 May;7(5):ofaa103. PubMed PMID: 32391401. Pubmed Central PMCID: 7200084.

22. Chua KH, Tan EW, Chai HC, Puthuchery SD, Lee PC, Puah SM. Rapid identification of melioidosis agent by an insulated isothermal PCR on a field-deployable device. PeerJ. 2020;8:e9238. PubMed PMID: 32518734. Pubmed Central PMCID: 7261116.

23. Ulrich MP, Norwood DA, Christensen DR, Ulrich RL. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. J Med Microbiol. 2006 May;55(Pt 5):551-9. PubMed PMID: 16585642.

24. Logan J, Logan JM, Edwards KJ, Saunders NA. Real-time PCR: current technology and applications: Horizon Scientific Press; 2009.

25. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009 Apr;55(4):611-22. PubMed PMID: 19246619.

26. Hodgson K, Engler C, Govan B, Ketheesan N, Norton R. Comparison of routine bench and molecular diagnostic methods in identification of *Burkholderia pseudomallei*. Am Soc Microbiol; 2009. p. 1578-80.

27. Kaestli M, Mayo M, Harrington G, Watt F, Hill J, Gal D, et al. Sensitive and specific molecular detection of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, in the soil of tropical northern Australia. *Am Soc Microbiol*; 2007. p. 6891-7.
28. Lee M-A, Wang D, Yap EH. Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK; 2005. p. 413-7.
29. Merritt A, Inglis TJJ, Chidlow G, Harnett G. PCR-based identification of *Burkholderia pseudomallei*. *SciELO Brasil*; 2006. p. 239-44.
30. Novak RT, Glass MB, Gee JE, Gal D, Mayo MJ, Currie BJ, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. *Am Soc Microbiol*; 2006. p. 85-90.
31. Supaprom C, Wang D, Leelayuwat C, Thaewpia W, Susaengrat W, Koh V, et al. Development of real-time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in clinical blood specimens. *Am Soc Microbiol*; 2007. p. 2894-901.
32. Thibault FM, Valade E, Vidal DR. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. *Am Soc Microbiol*; 2004. p. 5871-4.
33. Bowers JR, Engelthaler DM, Ginther JL, Pearson T, Peacock SJ, Tuanyok A ,et al. BurkDiff: A Real-Time PCR Allelic Discrimination Assay for *Burkholderia Pseudomallei* and *B. mallei*. *PloS one*. 2010;5(11):e15413.
34. Podnecky NL, Elrod MG, Newton BR, Dauphin LA, Shi J, Chawalchitiporn S, et al. Comparison of DNA Extraction Kits for Detection of *Burkholderia pseudomallei* in Spiked Human Whole Blood Using Real-Time PCR. *PloS one*. 2013;8(2):e58032.
35. Suppiah J, Thimma JS, Cheah SH, Vadivelu J. Development and evaluation of polymerase chain reaction assay to detect *Burkholderia* genus and to differentiate the species in clinical specimens. *FEMS Microbiology Letters*. 2010;306(1):9-14.
36. Price EP, Dale JL, Cook JM, Sarovich DS, Seymour ML, Ginther JL, et al. Development and Validation of *Burkholderia pseudomallei*-Specific Real-Time PCR Assays for Clinical, Environmental or Forensic Detection Applications. *PloS one*. 2012;7(5):e37723.