مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره اول، شماره سوم، تابستان ۱۳۹۰

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی تنوع ژنتیکی لاکتوباسیل های جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران توسط RAPD PCR

فرزانه تفویضی*[۱]، مریم تاج آبادی ابراهیمی[۲]، میترا حیدری نصر آبادی[۱]، هدی بهرامی[۳]

[۱] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران-ایران
[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران- ایران
[۳] کارشناس، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران- ایران

چکیده

سابقه و هدف: لاکتوباسیل ها متشکل از ارگانیزم های گرم مثبت، کاتالاز منفی، بدون اسپور و میله ای شکل هستند و بیش از ۹۰ گونه از این باکتری شناخته شده است. سوش های متعددی از لاکتوباسیل های پروبیوتیک در طیف وسیعی از محصولات غذایی انسان ها وجود دارند. ظرفیت های پروبیوتیکی وابسته به سوش می باشند، انتخاب متدهای قابل اطمینان برای شناسایی لاکتوباسیل ها از اهمیت خاصی برخوردار است با توجه به وقت گیر بودن و ابهام آمیز بودن روش های بیوشیمیایی، روش های مولکولی مناسب تر و دقیق تر بوده و جایگزین روش های قبلی شده اند. هدف از این تحقیق، شناسایی لاکتوباسیل های جداشده از محصولات لبنی سنتی ایران با استفاده از مارکرهای RAPD به عنوان یک ابزار موثر در طبقه بندی لاکتوباسیل ها و بررسی تنوع ژنتیکی در سویه های جدا شده می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۲۰ ایزوله از محصولات لبنی مختلف جدا شدند و پس از کشت بر روی محیط اختصاصی MRS استخراج DNA از باکتری ها انجام شد و برای بررسی تنوع ژنتیکی از مارکرهای RAPD استفاده شد.

یافته ها: از ۲۰ پرایمر به کار رفته در این تحقیق، ۱۹ پرایمر باندهای قابل کد گذاری ایجاد کردند. تعداد کل باندهای تکثیر شده توسط کل پرایمرها، ۲۲۵ عدد برآورد شد که شامل ۲۱۹ باند پلی مورف، ۶ باند مشترک و ۶۳ باند اختصاصی بود. توسط نرم افزار NTSYS-PC ماتریس تشابه بر اساس ضریب Jaccard برای ژنوتیپ ها محاسبه شد. سپس گروه بندی ایزوله ها با روش UPGMA و NJ توسط نرم افزار NTSYS-PC انجام گرفت و نتایج یکسان و مشابهی از مقایسه گروه بندی با دو روش مختلف حاصل شد.

نتیجه گیری: براساس ماتریس تشابه k2l3 و y1m4 بیشترین تشابه ژنتیکی را با یکدیگر نشان دادند و در هر دو دندروگرام با هم در یک گروه قرار گرفتند. در گروه بندی براساس روش UPGMA دو شاخه اصلی A و B وجود داشت. شاخهٔ اصلی A به دو زیر گروه با ژنوتیپ های y_2f_3 ، y_1l_4 ،c_6m_3و c_1d_2 و شاخهٔ اصلی B نیز به دو گروه با ژنوتیپ های y_1m_4 ،k_2l_3 ، y_2c_4 ، d_3b_1 ، c_2h_1 و p تقسیم شدند.

کلمات کلیدی: لاکتوباسیل، محصولات لبنی سنتی، تنوع ژنتیکی، RAPD PCR، دندروگرام UPGMA.

مقدمه

لاکتوباسیل ها متشکل از باکتری های گرم مثبت، کاتالاز منفی، بدون اسپور و میله ای شکل هستند و بیش از ۹۰ گونه از این باکتری شناخته شده است (kandler et al., 1986). سوش های متعددی از لاکتوباسیل های پروبیوتیک در طیف وسیعی از محصولات غذایی انسان ها و حیوانات وجود دارند (Reuter, 2001; Tannock, 1998). از آنجا که ظرفیت های پروبیوتیکی وابسته به سوش می باشند، انتخاب متدهای قابل اطمینان برای شناسایی لاکتوباسیل ها از اهمیت

آدرس نویسنده مسئول: دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، دانشکده ی علوم زیستی، گروه زیست شناسی.
Email: tafvizi@piau.ac.ir
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۱/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۱/۲۹

خاصی برای محققین برخوردار است. جنس ها از نظر فنوتیپی ناهمگن هستند و شناسایی سوش های لاکتوباسیل بسیار وابسته به خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی است (kandler et al., 1986). به کارگیری روش های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بسیار وقت گیر و ابهام آمیز می باشند. برای مثال *L.gasseri* و *Lacidophilus* هر دو دارای زیستگاه یکسان و مشابهی هستند و از نظر خصوصیات فنوتیپیکی از یکدیگر قابل تشخیص نیستند. در بسیاری از آزمایشگاه های تحقیقاتی و رده بندی باکتری ها، کوشش در طبقه بندی باکتری ها بر اساس تست های مولکولی از جمله هیبریداسیون DNA، تعیین درصد گوانین + سیتوزین در ژنوم، (RFLP) Restriction Fragment Lenght Polymorphism بررسی توالی ribosonal RNA (rRNA)16s و Polymerase Chain Riaction (RAPD-PCR) Randomly Ampliifed Polymorphic DNA می باشد (Lick et al., 2003 Callon et al., 2004). امروزه شناسایی از روش های فنوتیپیکی به ژنوتیپیکی تغییر یافته است، چون دارای دقت و صحت بالاتری هستند. مطالعات مولکولی از جمله هیبریداسیون DNA و شناسایی از طریق ژن های rRNA می توانند در شناسایی مفید واقع شوند ولی این روش نیز وقت گیر است و نیاز به داشتن اطلاعات کافی درباره توالی ژن های rRNA دارد. برای گونه های بسیار نزدیک نیز آنالیز توالی ژن های rRNA به اندازه کافی اختصاصی نیست. تکنیک plasmid profiling ابتدا توسط (Tannock et al.,1990). به کار گرفته شد، گرچه این تکنیک نتوانست برای طبقه بندی سوش هایی که فاقد پلاسمید بودند به کار رود. Henrikson در سال ۱۹۹۵ از پروفایل پروتئینی برای مطالعه لاکتوباسیل های روده ای و گروه بندی آنها در خوک ها استفاده کرد. از آنجا که در پروفایل پروتئینی باندهای بسیاری دیده شد، تفسیر نتایج و گروه بندی لاکتوباسیل ها کمی مشکل بود. در بین روش های مولکولی روش RAPD-PCR روش قابل اعتمادی است که با صحت بسیار بالا و به طور موفقیت آمیزی در طبقه بندی و تعیین ارتباطات ژنتیکی بسیاری از ارگانیزم ها از جمله قارچ ها، ویروس ها و گونه های لاکتوباسیل مورد استفاده قرار می گیرد.

اساس روش RAPD-PCR بر پایه استفاده از تنها یک پرایمر با طول کوتاه و توالی‌های اختیاری است. در این روش قطعات زیادی از ژنوم (۱ تا ۱۰ قطعه و یا حتی بیشتر) به طور تصادفی تکثیر می‌شوند. حضور و عدم حضور این قطعات یا باندها معیاری برای بررسی پلی‌مورفیسم (چندشکلی) در بین افراد مختلف است. پلی‌مورفیسم مشاهده شده در تکنیک RAPD به دلیل تفاوت در محل اتصال پرایمرها (جهش‌های نقط های) و یا بازآرایی در داخل قطعات تکثیر یافته (حذف، واژگونی و دخول) می‌باشد (Williams et al., 1990). پرایمرهای RAPD کوتاه (معمولاً ۱۰ نوکلئوتید) هستند و حداقل حاوی ۵ عدد G+C می‌باشند. نشانگرهای RAPD دارای مزیت‌های فراوانی نسبت به سایر نشانگرها می‌باشند که از آن جمله می‌توان به مواردی از جمله، هزینه کمتر نسبت به بسیاری از تکنیک‌های دیگر، نمونه‌برداری تصادفی از بسیاری از جایگاه های ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA جهت طراحی و ساخت پرایمر، امکان بررسی همزمان چندین جایگاه ژنی در ژنوم نمونه‌ها، سرعت نسبتاً زیاد برای بررسی تعداد زیادی نمونه، عدم نیاز به کاوشگر، مواد رادیواکتیو، عدم نیاز به مقدار زیاد DNA الگو، امکان بررسی گونه‌های مختلف با پرایمرهای یکسان و مطالعه تعداد زیادی نمونه در مدت کوتاه تر نسبت به سایر روش ها ذکر کرد. نشانگرهای مولکولی RAPD کاربرد فراوانی دارند که از جمله می‌توان به بررسی تنوع ژنتیکی، بررسی ژنتیک جمعیت، فیلوژنتیک، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تعیین پیوستگی با صفات مطلوب، بررسی جایگاه های ژنی کنترل کننده صفات کمی، بررسی پدیدهٔ Introgression، طبقه بندی لاین ها از نظر توانایی تولید هیبریدهای مختلف، شناسایی ارقام مختلف گیاهی، ژنوتیپ های مختلف باکتریایی، انگشت نگاری DNA، غربال گری تعداد بسیاری از نمونه ها در مدت کوتاه و شناسایی و بررسی تفاوت ها در سطح سوش اشاره کرد. همچنین به دلیل اینکه این نشانگرها تنوع مناسبی را در داخل و بین گونه‌ها آشکار می‌کنند برای آنالیزهای فیلوژنتیکی مناسب می‌باشند (Williams et al., 1990). هدف از این تحقیق، شناسایی لاکتوباسیل های جداشده از محصولات لبنی سنتی ایران با استفاده از مارکرهای RAPD به عنوان یک ابزار موثر در طبقه بندی لاکتوباسیل ها و بررسی تنوع ژنتیکی در

سویه های جدا شده می باشد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی و طبقه بندی، نرم افزار NTSYS-PC و روش های UPGMA (Unweighted Pair Group Method by Arithmetic Average) و NJ (Neighbor Joining) برای تجزیه خوشه ای مورد استفاده قرار گرفته است. نتایج حاصل از طبقه بندی با دو روش NJ و UPGMA با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفته اند. با توجه به گسترش فزآینده محصولات لبنی صنعتی به جای محصولات سنتی امکان از دست دادن بسیاری از باکتری های پروبیوتیک وجود دارد، بنابراین با توجه به اهمیت لاکتوباسیل ها در سلامت انسان جداسازی، شناسایی و طبقه بندی مولکولی این باکتری ها از منابع سنتی و به کارگیری نتایج در تولید محصولات لبنی امری ضروری به نظر می رسد. با در نظر گرفتن تنوع بالای محصولات لبنی سنتی و محلی در ایران و نیز پراکندگی آنها در مناطق مختلف کشور و عدم آگاهی و شناخت کامل از فلور باکتری های پروبیوتیکی، ضرورت انجام تحقیق روشن می گردد.

مواد و روش ها

کشت باکتری - در این مطالعه ۲۰ باکتری از محصولات مختلف لبنی سنتی ازجمله ماست، پنیر و کشک که قبلا توسط تاج آبادی و همکاران جداسازی شده بود مورد استفاده قرا گرفت و پس از کشت در محیط انتخابی MRS (Man ROGOSA and SHARP)، برای بررسی تنوع ژنتیکی با روش RAPD مورد مطالعه قرار گرفتند. در گام اول جهت استخراج DNA، باکتری ها در محیط MRS کشت شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۸ درصد دی اکسید کربن گرم خانه گذاری شدند.

استخراج DNA- استخراج DNA از ۲۰ ایزوله مذکور و باکتری استاندارد *L. Plantaum* DSMZ 6648 با استفاده از هضم آنزیمی لیزوزیم و با اندکی تغییرات در روش Araújo مورد استفاده قرارگرفت (Araújo et al., 2004). از کشت ۲۴ ساعته جهت استخراج DNA استفاده شد. ۲ml از محیط کشت ۲۴ ساعته باکتری ها به میکروتیوپ های ۲ میلی لیتری انتقال یافتند و در 3000 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب ها ۳ بار با بافر TEN (Tris Hcl 100Mm ،NaCl 150mM ،EDTA 100mm) و هر بار در 3000 rpm به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. به رسوب های حاصل، بافری متشکل از ۲۰۰ میکرولیتر بافر TEN و 4 mg/ml لیزوزیم اضافه شد و به دنبال آن انکوباسیون به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد صورت گرفت. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول ۸/۵ درصد سدیم دو دسیل سولفات اضافه گردید و سپس انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۷۵ درجه سانتی گراد انجام گرفت. ۱۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار با pH 5.2 روی یخ به نمونه ها اضافه شد، نمونه ها ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در 3000 rpm انجام شد. مایع رویی جدا شد و برای خالص سازی DNA از پروتئین ها از مخلوط فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل با نسبت ۲۴:۲۵:۱ استفاده شد. در مرحله رسوب دهی DNA ایزوپروپانول سرد مورد استفاده قرار گرفت، در مرحلهٔ آخر برای شستشو، به کار برده شد. رسوب های DNA در دمای آزمایشگاه خشک شدند.

جدول -۱ نام و ترادف پرایمرهای تصادفی مورد استفاده در تحقیق

OPA-08	GTGACGTAGG
OPA-13	CAGCACCCAC
OPB-05	TGCGCCCTTC
OPB-07	GGTGACGCAG
OPB-20	GGACCCTTAC
OPC-01	TTCGAGCCAG
OPC-02	GTGAGGCGTC
OPC-06	GAACGGACTC
OPC-09	CTCACCGTCC
OPH-02	TCGGACGTGA
OPH-07	CTGCATCGTG
OPH-14	ACCAGGTTGG
OPH-16	TCTCAGCTGG
OPI-05	TGTTCCACGG
OPI-07	CAGCGACAAG
OPI-12	AGAGGGCACA
OPM-04	GGCGGTTGTC
OPM-17	TCAGTCCGGG
OPR-15	GGACAACGAG

رسوب های حاصله در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل شدند. جهت بررسی کیفیت DNA از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۷ درصد استفاده شد. در مرحله سوم، بهینه سازی واکنش RAPD-PCR با پرایمرهای تصادفی انجام گرفت. برای انجام واکنش PCR، ۲۰ پرایمر RAPD تهیه شده از شرکت MWG-OPERON مورد استفاده قرار گرفت. نام و ترادف این پرایمرها در جدول-۱ ذکر شده است. واکنش PCR متشکل از ۱ نانوگرمDNA الگو، ۱x Buffer PCRکه شامل(10mM Tris Hcl PH=8.8, 250 mM kcl) 0.8 µM و200 µM dNTP پرایمرهای تصادفی ۱۰ جفت بازی و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتردر نظر گرفته شد. تکثیر DNA در دستگاه PalmcyclerGp-001 (Corbet, Australia) انجام شد. دناتور شدن DNA الگو در دمای ۹۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه انجام گرفت و به دنبال آن واکنش تکثیری DNA در ۳۵ سیکل به شرح زیر انجام شد: دناتوره شدن در۹۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر در ۳۶ 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 x TBE 0.5 (0.5 mM EDTA, pH 8.0, 44.5 mM Tris/ Borate) استفاده شد. ژل با رنگRima Sight DNA Stain رنگ آمیزی شد و با نور uv، مورد بررسی قرار گرفت (Sambrook et al., 2001). مارکر Gene Ruler (fermentas 100bp) به عنوان مارکر مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله ۹ ایزوله ای که پروفایل باندی (الگوی باندی) متفاوتی نشان دادند و پلی مورفیسم بالایی داشتند به همراه باکتری *L. Plantarum* با کد DSMZ 6648 به عنوان باکتری استاندارد برای آنالیزها و بررسی تنوع ژنتیکی با نرم افزار NTSYS-PC انتخاب شدند. نام ایزوله های انتخاب شده برای بررسی تنوع ژنتیکی در جدول ۲ ذکر شده است.

داده های RAPD به صورت دو حالته می باشند. بدین صورت که حضور باندها با کد ۱ و عدم حضور باندها با کد صفر مشخص می شود. پس از ارزش گذاری نشانگرهای RAPD به طریق فوق، آنالیزهای آماری زیر بر روی داده ها انجام گرفت. ضریب تشابه Jaccard در بین ایزوله های مورد مطالعه محاسبه شد و گروه بندی ژنوتیپ ها با نرم افزار NTSYS-PC و با استفاده از روش هایUPGMA و NJ انجام گرفت. دندروگرام های حاصل از دو روش با یکدیگر مقایسه شدند.

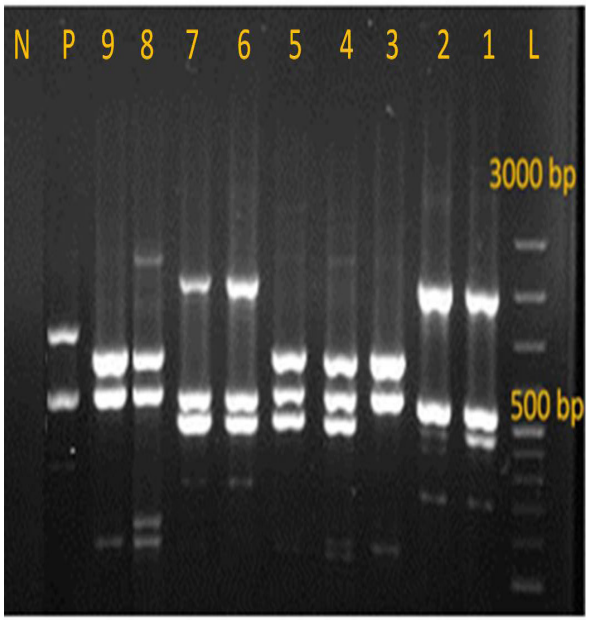
نتایج

از ۲۰ پرایمر به کار رفته در این تحقیق، ۱۹ پرایمر باندهای قابل کد گذاری ایجاد کردند. در پروفایل های بدست آمده، باندهای در محدوده 300bp تا 3000 bp کد گذاری شدند (شکل۱). تعداد کل باندهای تکثیر شده توسط کل پرایمرها، ۲۲۵ عدد برآورد شد که شامل ۲۱۹ باند پلی مورف، ۶ باند مشترک و ۶۳ باند اختصاصی بود. شکل-۲ گویای تعداد کل باندهای پلی مورف، اختصاصی و مشترک برای هر پرایمر می باشد. پرایمرهای H16 و H14 با ۱۶ عدد دارای بیشترین باند پلی مورف و پرایمر I05 با ۵ عدد دارای کمترین باند

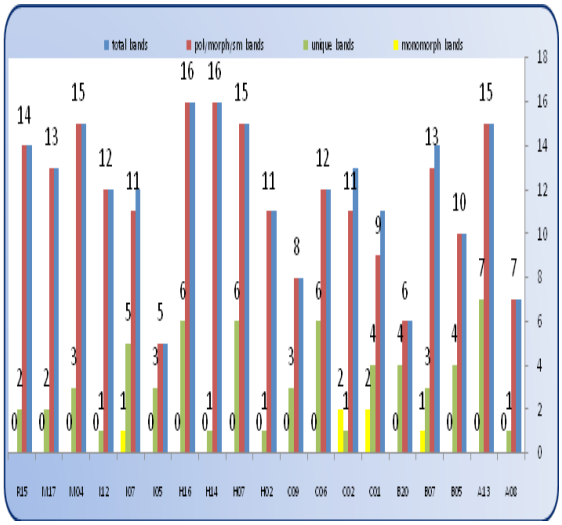
جدول -۲ منبع سویه های لاکتوباسیل

منبع جداسازی	کد ایزوله
پنیر لیقوان تازه	C۶m۳
پنیر لیقوان دو ماهه	C۱d۲
پنیر لیقوان تازه	C۲h۱
ماست	Y۱l۴
ماست حلیی	Y۲f۳
ماست لیقوان	Y۱m۴
ماست حلیی	Y۲c۴
دوغ لیقوان	D۳b۱
کشک	K۲l۳

پلی مورف بودند. تمامی پرایمرها باند اختصاصی تولید کردند. پرایمر A13 با ۷ باند، بیشترین باند اختصاصی و پرایمرهای I12، H02، H14، A08 و C02 هر کدام با یک باند اختصاصی، کمترین باند اختصاصی را ایجاد کردند. در پروفایل بعضی از پرایمرها باند مشترک مشاهده شد از جمله برای دو پرایمر B07 و I07 یک باند مشترک و پرایمرهای C01 و C02 دو باند مشترک محاسبه شد و بقیه پرایمرها باند مشترکی در ایزوله ها تولید نکردند (شکل ۲).

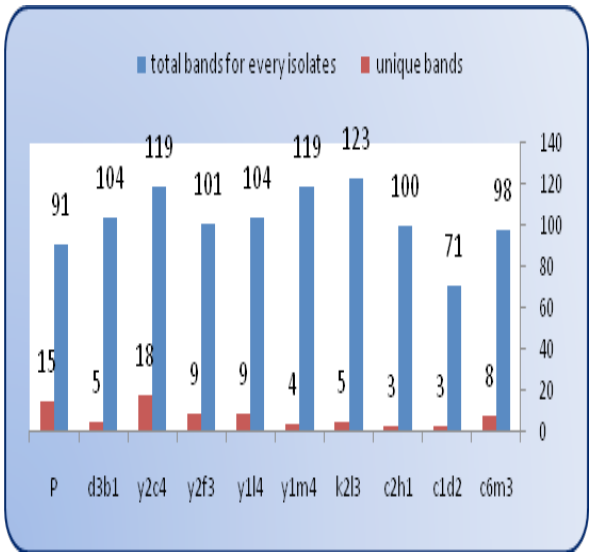


شکل ۱- الگوی باندی تکثیر شده ایزوله ها توسط پرایمر I۰۵.مارکر:: L ،۱ C۶m۳، ۲:C۱d۲، ۳: C۲h۱، ۴:K۲l۳،۵: Y۱m۴، ۶: y۱l۴، ۷: Y۲f۳ ۸: Y۲c۴، ۹: D۳b۱،P: Plantarum DSMZ ۶۶۴۸ و کنترل منفی:N.



شکل ۲- نمودار تعداد باندهای پلی مورف، مشترک و اختصاصی در هر پرایمر.

تعداد کل باندها و باندهای اختصاصی تولید شده در هر ایزوله نیز جداگانه محاسبه شد که در شکل- ۳ خلاصه شده است. به طوری که ایزولهٔ k_2l_3 با 123 باند، بیشترین و c_1d_2 با ۷۱ باند، کمترین باندها را در واکنش PCR تولید کردند. از طرفی ایزوله y_2c_4 با ۱۸ باند اختصاصی، ایزوله های c_1d_2 و c_2h_1 هر کدام با ۳ باند به ترتیب بیشترین و کمترین باندهای اختصاصی را از آن خود ساختند. از باندهای مشترک می توان به باند۱۱۰۰ bpمتعلق به پرایمر I07، باند 1700 bp پرایمر B07، باندهای1500 bp و 2000bpپرایمر C01 و باندهای 900bp و 2500bp پرایمر C02 اشاره کرد.



شکل ۳- تعداد کل باندها و باندهای اخ تصاصی تولید شده در هر ایزوله.

برخی از پرایمرها باندهایی تولید کردند که در تمامی ایزوله ها جز یک ایزوله وجود داشت. برای مثال باند 1300bp تکثیر یافته توسط پرایمر C09، باند 1000 bp پرایمر C01، باند2000 bp پرایمر A08، باند2000 bpپرایمر A13، باند 2700bp پرایمر C02 و باند2500 bp حاصل از پرایمر H07 به ترتیب در تمامی ژنوتیپ ها غیر از ایزوله های c_1d_2، c_6m_3، c_1d_2، y_1l_4 و P و c_1d_2 تکثیر یافتند. ابتدا توسط نرم افزار NTSYS-PC ماتریکس تشابه بر اساس ضریب Jaccard برای ژنوتیپ ها محاسبه شد (جدول ۳)، سپس گروه بندی ایزوله ها با روش UPGMA و NJ توسط نرم افزار NTSYS-PC انجام گرفت و نتایج یکسان و مشابهی از مقایسه گروه بندی با دو روش مختلف حاصل شد (شکل ۴). براساس ماتریکس تشابه k_1l_4 و y_1m_4 بیشترین تشابه ژنتیکی را با یکدیگر نشان دادند و در هر دو دندروگرام با هم در یک گروه قرار گرفتند. در گروه بندی

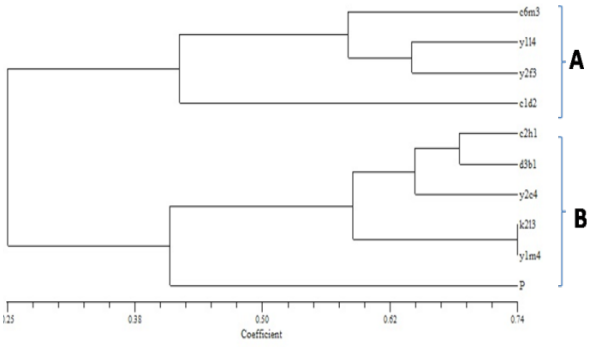
جدول ۳- ماتریس تشابه بر اساس ضریب Jaccard برای ایزوله ها.

c6m3	c1d2	c2h1	k2f3	y1m4	y1l4	y2f3	y2c4	d3b1	P
1.0000000									
0.4739837	1.0000000								
0.2692308	0.2214286	1.0000000							
0.3233633	0.2933333	0.6816403	1.0000000						
0.2916667	0.2418301	0.6102941	0.7410072	1.0000000					
0.6160000	0.4112903	0.2438024	0.3274854	0.2670455	1.0000000				
0.5426357	0.4790856	0.2484472	0.3493976	0.3017751	0.6400000	1.0000000			
0.2269887	0.1875000	0.6486166	0.5316456	0.5555556	0.2185792	0.2429379	1.0000000		
0.2540684	0.1936301	0.6359504	0.5986915	0.6177372	0.2606061	0.2732919	0.6397059	1.0000000	
0.2193845	0.2090000	0.4000902	0.3896104	0.4093990	0.2264181	0.2229299	0.4286714	0.3829787	1.0000000

براساس روش UPGMA دو شاخه اصلی A و B وجود داشت. شاخهٔ اصلی A به سه زیر گروه با ژنوتیپ های c_6m_3،y_1l_4،y_2f_3 و c_1d_2 و شاخهٔ اصلی B به چهار گروه با ژنوتیپ های c_2h_1 ،d_3b_1 ،y_2c_4 ،k_2l_3 و y_1m_4 و p تقسیم شدند. در دندروگرام حاصل شده با روش NJ نیز دو گروه اصلی دیده شد و نتایج مشابهی با دندروگرام حاصل از روش UPGMA دیده شد (فقط دندروگرام UPGMA نمایش داده شده است).

بحث

تحقیقات نشان می دهد که محصولات لبنی سنتی، منبع غنی از باکتری هایی با پتانسیل پروبیوتیکی می باشند که می توانند با اضافه شدن به محصولات لبنی صنعتی در بهبود کیفیت سلامت و افزایش



شکل -۴ دندروگرام حاصل از تجزیهٔ خوشه ای ایزوله های جدا شده با روش UPGMA توسط نرم افزار NTSYS-PC.

قدرت ایمنی تأثیر گذارند، لذا شناسایی و طبقه بندی این باکتری ها امری ضروری است. شناسایی لاکتوباسیل ها از طرق مختلف بیوشیمیایی، فنوتیپیکی و مولکولی قابل انجام است ولی لازم به ذکر می باشد که روش های بیوشیمیایی وفنوتیپیکی دارای معایبی است که می توان از آن جمله به عدم دقت کافی، وقت گیر بودن، عدم تمییز کامل بین سوش های مختلف یک گونه و در مواردی ابهام آمیز بودن نتایج اشاره کرد. روش های مختلف مولکولی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و طبقه بندی فیلوژنیک در باکتری ها وجود دارد که یکی از آنها به کارگیری مارکرهای مولکولی است. مارکرهای مولکولی در کاهش سایز جمعیت در جهت تعیین میزان تنوع ژنتیکی در مراحل اولیه مفید خواهند بود. یکی از این مارکرها، مارکرهای مولکولی RAPD می باشد. روش RAPD-PCR یک روش دقیق و آسان در جهت شناسایی تنوعات ژنتیکی می باشد و دارای مزایای بسیاری است که از آن جمله می‌توان به کارگیری مقادیر کم DNA، عدم طراحی پرایمر اختصاصی و شناسایی ژن مورد نظر، آشکار سازی آسان بر روی ژل آگارز، کم هزینه تر بودن آن و سریع تر انجام یافتن روش اشاره کرد (Williams et al., 1990 ;Weising et al., 1995). بسیاری از محققین در بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ های باکتری ها از جمله لاکتوباسیل ها، مارکرهای RAPD را به کار برده اند که در ادامه راجع به آن بحث می شود. همان طور که اشاره شد در غربال گری اولیه نمونه ها و انتخاب ایزوله های برتر روش های بیوشیمیایی چندان کارآمد نیستند چرا که چند ایزوله ممکن است نتایج یکسانی در تست های بیوشیمیایی داشته باشند در صورتی که با انجام روش های مولکولی دارای پروفایل های مختلفی باشند. در بسیاری از موارد، تطابقی بین نتایج حاصل از روش های بیوشیمیایی و مولکولی وجود ندارد. (حجازی و همکاران ۱۳۸۹، Abdelhalim et al., 2009, Johanson et al., 1995) لذا امروزه شناسایی از روش های بیوشیمیایی به روش های مولکولی سوق یافته است.

در این تحقیق نیز در غربال گری اولیه توسط RAPD-PCR

تنها ژنوتیپ های که پروفایل ژنتیکی متفاوتی نشان دادند برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند و بدین ترتیب از ۲۰ ایزوله جدا شده ۹ ایزوله غربال شدند. در تحقیق مشابهی که توسط Abriouel بر روی تنوع میکروبی موجود در پنیرهای Alberquilla تولید شده از مخلوط شیر بز و گوسفند در کوه های Alpujjara انجام گرفت، ۲۰۶ ایزوله جداسازی شد که با گروه بندی توسط RAPD-PCR در ۵۲ گروه قرار گرفتند و آنالیز پروفایل RAPD، الگوی بسیار متفاوتی را در بین ایزوله ها نشان داد (Abriouel et al., 2008). Pulido و همکاران در سال ۲۰۰۵، از caper (یک نوع میوه تخمیر شده)، ۱۳۲ باکتری جدا کردند سپس در غربال گری اولیه با روش RAPD-PCR تعداد ایزوله ها به ۷۵ عدد کاهش یافت. بطور مشابهی در پروفایل های RAPD تنوع بسیاری در ایزوله ها شناسایی شد. برای بررسی بیشتر از روش توالی سنجی برای شناسایی دقیق ایزوله ها استفاده شد. Svec و همکاران در سال ۲۰۱۰، بر روی ۶۹ گونه لاکتوباسیل از جمله *L. fermentum*، *L. rhamnosus*، *L. casei/paracasei*، *L. gasseri*، *L. salivarius*، *L. plantarum* از کودکان ناقل (در حفره دهانی) جداسازی شدند و با دو روش ribotyping و RAPD-PCR تحت آنالیزهای مولکولی قرارگرفتند. نتایج نشان داد که RAPD روش مناسب تر و دقیق تری در ژنوتایپینگ سوش های لاکتوباسیل نسبت به روش ribotyping بود. RAPD یک روش موفقیت آمیز و کار آمد در شناسایی و تمایز باکتری ها در سطوح جنس، گونه و حتی سوش می باشد. روش RAPD-PCR نشان داده است که بطور موفقیت آمیزی قادر به مشخص نمودن ارگانیزم ها در سطح سوش است. کل ژنوم برای ایجاد پروفایل DNA و برای شناسائی سوش های Bifidobacterium توسط Roy به کار برده شد (Roy et al.,1996) به علاوه به طور موفقیت آمیزی جهت شناسائی *L. acidophillus* وگونه های نزدیک به آن به کار رفت (Du plessis et al., 1995).

kwon ارتباط ژنتیکی ۶ سوش لاکتوباسیل و پنج ایزوله جداشده از شیر تخمیر شده را با کمک RAPD-PCR مشخص نمود. ۴۲ پرایمر در تحقیق مورد استفاده قرار گرفت و نتایج با نرم افزار NTSYS ارزیابی شد. تمام لاکتوباسیل ها در سه گروه مجزا قرار گرفتند. بر اساس فاصله ژنتیکی بدست آمده مشخص شد که باکتری های LTO1, LTO2 احتمالا زیر گونه هایی از *L. bulgaricus* بودند (kwon et al., 2000).

امروزه پروفایل RAPD به عنوان یک ابزار فیلوژنتیکی و تاکسونومی معتبر مورد قبول همگان است (Akopynaz et al.,1992 Kresovich et al., 1992, Scott et al., 1992). Abdelhalim تکنیک انگشت نگاری RAPD-PCR و سیستم API را برای شناسایی و گروه بندی لاکتوباسیل های جدا شده از شیرهای سنتی (Roab) به کار بردند. ۱۴ ایزوله میله ای شکل لاکتوباسیل براساس الگوی RAPD، پنج گروه مجزا تشکیل دادند. ۲۸ ایزوله Coccal لاکتوباسیل بر اساس پروفایل RAPD ، ۹ گروه مجزا تشکیل دادند. در نهایت پروفایل RAPD با الگوهای سیستم API مورد مقایسه قرار گرفت (Abdelhalim et al., 2009). Weiss از مارکرهای RAPD برای مشخص نمودن سوش های پروبیوتیکی *L.reuteri* استفاده کردند (Weiss et al., 2005). Antonson در سال ۲۰۰۳ از تکنیک RAPD-PCR برای شناسایی لاکتوباسیل های جداشده از پنیر استفاده کردند. بیشتر ایزوله ها (۷۶٪) لاکتوباسیلوس پاراکازئی بودند، اما لاکتوباسیل *L. Larvatus, L. Plantarum*, *L.* Rhamnosus نیز شناسایی شدند (Antonson et al., 2003).

حجازی و همکاران در سال ۱۳۸۹، جداسازی و شناسایی باکتری های با پتانسیل پروبیوتیکی از فلور موجود در ماست و پنیر سنتی مناطق هریس و سراب را انجام دادند. برای رسیدن به این هدف، باکتری های اسید لاکتیک توسط روش های فنوتیپی (رنگ آمیزی گرم، تست های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی) جداسازی شدند و شاخص های اولیه پروبیوتیکی آنها (مقاومت به اسید، نمک های صفراوی) مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس برای شناسایی دقیق تر با جفت آغازگر های اختصاصی، ژن باکتری های لاکتوباسیلوس و انتروکوکسی تکثیر داده شد. با توجه به اینکه خصوصیات پروبیوتیکی تحت تاثیر سویه می باشد، تنوع داخل گونه های مشخص شده با استفاده از تکنیک RAPD و توالی بررسی شد. در پایان تحقیق، ۱۵ سویه لاکتوباسیلوس و ۱۶ سویه انتروکوکسی بعنوان فلور میکروبی طبیعی در محصولات لبنی مناطق هریس و سراب گزارش شدند.

در تحقیق حاضر ۲۰ پرایمر تصادفی مورد استفاده قرار گرفت. از ۲۲۵ باند شناسایی شده، ۲۱۹ باند پلی مورف و تنها ۶ باند مشترک بودند که این ارقام نشاندهنده تنوع ژنتیکی بالا در ایزوله ها می باشد. در تمامی ژنوتیپ ها باند اختصاصی ایجاد شد. با توجه به دندروگرام حاصل از روش UPGMA دو ایزوله k_2l_3 و y_1m_4 دارای بیشترین تشابه ژنتیکی با یکدیگر بودند (شکل ۴) و احتمالا دو سوش مختلف یک ژنوتیپ می باشند. ژنوتیپ های c_2h_1، d_3b_1، y_2c_4، k_2l_3 و y_1m_4 در گروه B و نزدیک به باکتری استاندارد لاکتوباسیلوس پلانتاروم گروه بندی شده اند و احتمال اینکه ایزوله های مذکور سوش های متفاوتی از لاکتوباسیلوس پلانتاروم باشند وجود دارد (شکل ۴). از طرفی قرار گرفتن دو ایزولهٔ y_1l_4 و y_2f_3 با هم در یک گروه می تواند به این دلیل باشد که هر دو از یک منبع مشترک (ماست) جدا شدند و دو سویه بسیار نزدیک به هم می باشند هم چنین دو سویهٔ c_6m_3 و c_1d_2 جدا شده از پنیر نیز با هم و در گروه A قرار گرفته اند البته سویهٔ c_1d_2 با اندکی فاصله به سه ژنوتیپ دیگر متصل می شود. این تحقیق نشان می دهد که مارکر RAPD یک مارکر قوی و مؤثر در شناسایی و غربال گری اولیه نمونه ها، بررسی تفاوت های بین گونه ای و شناسایی در حد سوش می باشد و در مقایسه با روش های بیوشیمیایی نیاز به صرف وقت و هزینه کمتری دارد. از آنجا که صفات پروبیوتیکی وابسته به سوش می باشند بنابراین شناسایی سوش ها و بررسی تنوع ژنتیکی بین سوش ها تنها از طریق روش های مولکولی امکان پذیر است. برای شناسایی دقیق تر نیاز به توالی یابی ایزوله ها می باشد که در تحقیقات آتی انجام خواهد یافت.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند به جهت تسهیل در انجام امور این تحقیق و تامین هزینه مالی طرح قدردانی می گردد.

منابع

۱. حجازی محمد امین، لطفی حاجیه، زنجانی بهرام ملکی، برزگری ابوالفضل. جداسازی، شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری های با پتانسیل پروبیوتیکی از محصولات لبنی سنتی مناطق هریس و سراب. مجلهٔ علمی-پژوهشی پژوهش های صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز. ۱۳۸۹؛ شماره ۱ جلد ۲۰/۳ : ۱۹-۱.

۲. تاج آبادی ابراهیمی مریم، حجازی محمد امین، غفاری رضا، جعفری پروانه. توانایی آنتاگونیسم لاکتوباسیل های مقاوم به اسید و صفرا جدا شده از محصولات لبنی. مجلهٔ علمی-پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک. ۱۳۸۸؛ شماره ۲، ۲۷-۱۷.

3-Abriouel H, Martín-Platero A, Maqueda M, Valdivia E and Martínez-Bueno M. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. Int J Food Microbiol, 2008; 127(3):200-8.

4-Abdelhalim AH, Eisa IE, and Ahmed AM. Use of the RAPD-PCR fingerprinting and API system for clustering lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese sour milk (Roab). Afr J Biotech, 2009; 8 (15): 3399-3404.

5-Akopynaz N, Bakanov NO, Westblom TU, Kresovich S and Berg DE. DNA diversity among clinical iso-lates of Helicobacter pylori detected by PCR-based RAPD fingerprinting. Nucleic Acids Res, 1992; 20: 5137-5142.

6-Antonsson M, Molin G and Ardo Y. Lactobacillus strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. Inter J Food Microbiol, 2003; 85:159– 169.

7-Araújo WL, Angellis DA, Azevedo JL. Direct RAPD evaluation of bacteria withoutconventional DNA extraction. Brazili Archiv Biol Technol, 2004; 47:375-80.

8-Callon C, Millet L and Montel MC.Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. J Dairy Res, 2004; 71: 231–244.

9-Du Plessis EM and Dicks LMT. Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus crispatus, Lactobacillus amylovorus, Lactobacillus gallinarum, Lactobacillu gasseri, and Lactobacillus johnsonii. Curr Microbiol, 1995; 31: 114-118.

10-Henricson A, Andre L and Conway PL. Distribution of lactobacilli in the porcine gastrointestinal tract. FEMS Microbiol Ecol, 1995; 16: 55-60.

11-Johansson ML, Quednau M, Molin G and Ahrné S. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for rapid typing of Lactobacillus plantarum strains, Lett Appl Microbiol, 1995; 21: 155–159.

12-Kandler O and Weiss N. (1986). In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G., Eds.) , 1986; 2: 1209-1234.

13-Kresovich S, Williams JGK, McFerson JR, Routman EJ and Schaal BA. Characterisation of genetic identities and relationships of Brassica oleracea L. via a random amplified polymorphic DNA assay. Theor Appl Genet, 1992; 85:190-196.

14 -Kwon O. Characterization of Isolated Lactobacillus spp. and Classification by RAPD-PCR Analysis. The J Microbiol, 2000; 137-144.

15-Lick S. Review: Typing systems for lactobacilli, Milchwissenschaft, 2003; 58: 256–260.

16-Pulido RP, Omar NB, Abriouel H, Lo´pez RL, Can˜amero MM and Ga´lvez A. Microbiological Study of Lactic Acid Fermentation of Caper Berries by Molecular and Culture-Dependent Methods. Applied and environ microbiol, 2005; 71(12): 7872–7879.

17-Reuter G, Probiotika – Möglichkeiten und Grenzen ihres. Einsatzes in Lebensmitteln, im Tierfutter und in pharmazeutischen Präparaten für Mensch and Tier. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2001; 114: 410–419.

18-Roy D, Ward P and Champagne G. Differentiation of bifdobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. Int J Food Microbiol, 1996; 29: 11-29.

19-Svec P, Kukletová M and Sedlácek I. Comparative evaluation of automated ribotyping and RAPD-PCR for typing of Lactobacillus spp. occurring in dental caries. Antonie Van Leeuwenhoek, 2010, 98(1):85-92.

20-Scott MP, Haymes KM and Williams SM. Parentage analysis using RAPD-PCR. Nucleic Acids Res, 1992; 20: 5493.

21-Tannock GW. Studies on the intestinal microflora: A prerequisite for the development of probiotics. Int Dairy J, 1998; 8:527–533.

22-Weising K, Nybon M, Wolf K and Meyer W. DNA finger printing in plants of fungi. Plant Genetic Resource Newsletters, 1995; 97: 3-39.

23-Weiss A, Peter Lettner H, Kramer W, Karl Mayer H and Kneifel W. Molecular Methods Used for the Identification of Potentially Probiotic Lactobacillus reuteri Strains. Food Technol Biotechnol, 2005; 43 (3): 295–300.

24-Williams JGK, Hanafey MK, Rafalski JA and Tingey SV. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods Enzymol, 1993; 218: 704-740.