PCR-DGGE: روشی نوین در دنیای میکروبیولوژی

آروین توکلی *

کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۰۵)

چکیده

PCR-DGGE یکی از روشهای مولکولی نوین میباشد که در ابتدا برای کشف پلی مورفیسم DNA ابداع شد. این تکنیک قطعات هم اندازه DNA را بر اساس اختلاف توالی جدا میکند. در حال حاضر این تکنیک در حوزه های مختلف علم میکروبیولوژی مانند میکروبیولوژی پزشکی، میکروبیولوژی غذایی و میکروبیولوژی صنعتی به کار میرود. در این روش پس از استخراج DNA از نمونه مورد نظر، DNA به کمک پرایمرهای یونیورسال از طریق PCR تکثیر میشود. سپس محصول PCR که حاوی قطعات هم اندازه ی DNA میباشد، بر روی ژل DGGE که حاوی شیبی از مواد دناتوره کننده (اوره و فرم آمید) است، قرار میگیرد و الکتروفورز انجام میشود. DGGE، DNA ی باکتریهای مختلف را تفکیک میکند که میتوانند برای آنالیز های بعدی مورد استفاده قرار گیرند. علی رغم وجود برخی محدودیت ها مانند محدودیت در سایز توالی مورد استفاده، PCR-DGGE میتواند به عنوان یک تکنیک سریع و کارآمد برای اهداف بسیاری در میکروبیولوژی مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه ضمن معرفی اجمالی این تکنیک، مزایا و محدودیت های آنرا در تحقیقات میکروبیولوژی مورد بررسی قرار میدهیم.

کلیدواژگان

تکنیک های مولکولی، میکروبیولوژی، PCR-DGGE.

* رایانامه نویسنده: arvin.tavakoli@gmail.com

مقدمه

استفاده از روش های مولکولی در مطالعات میکروبیولوژی در حال گسترش میباشد. این روش ها نسبت به روش های سنتی و وابسته به کشت سریعتر و کارآمدتر هستند. یکی از روشهای مولکولی نوین که در زمینه های مختلف و همچنین میکروبیولوژی به کار میرود، PCR-DGGE[1] میباشد. PCR-DGGE (از این پس DGGE نامیده میشود) یک شیوه ی انگشت نگاری ملکولی است که محصولات DNA تولید شده در PCR را تفکیک میکند. در واقع DGGE نوعی الکتروفورز است به منظور جدا کردن DNA های دو رشته ای محصول PCR، که از لحاظ طول مشابه هستند اما توالیهای متفاوت دارند. تکنیک جداسازی با روش DGGE بر اساس توصیفات اولیه ی فیشر و لرمن بنیان گذاشته شد و در ابتدا برای کشف تغییرات تک بازی و پلی مورفیسم در DNA به کار میرفت. اما امروزه در زمینه های مختلف مانند میکروبیولوژی به کار میرود. در این تکنیک DNA دو رشته ای در ژل پلی آکریل آمید حاوی شیبی از مواد دناتوره کننده، به طور جزئی دناتوره (واسرشت) میشود و مولکول منشعب ایجاد میشود. دناتوراسیون جزئی DNA قدرت تحرک آنرا در ژل پلی آکریل آمید کاهش میدهد. میزان دناتوراسیون و حرکت قطعات DNA دارای توالیهای مختلف بر روی ژل DGGE با یکدیگر متفاوت است. در واقع این تکنیک از تحرک متفاوت DNA های دو رشته ای و به طور جزئی دناتوره شده در بستر پلی آکریل آمید استفاده میکند (۱-۴). علی رغم وجود برخی محدودیت ها این روش دارای سرعت و کارآیی بالایی میباشد و میتواند در زمینه های مختلف علم میکروبیولوژی به کار رود. در این مطالعه پس از معرفی اجمالی تکنیک PCR-DGGE به بررسی جوانب کاربرد این تکنیک در علم میکروبیولوژی می پردازیم.

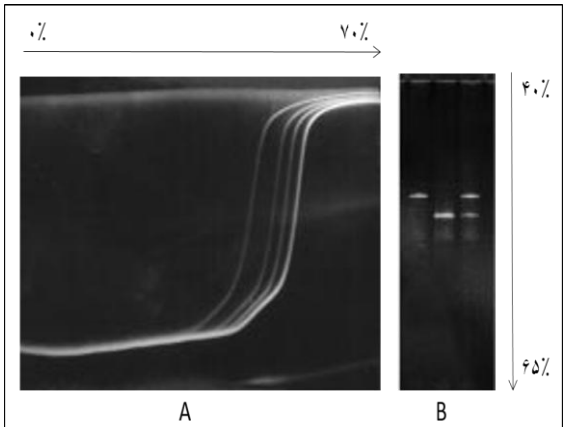
روش کار در تکنیک DGGE

همانطور که گفته شد DGGE نوعی الکتروفورز است که با داشتن محیط دناتوره کننده توالی های متفاوت DNA را تفکیک میکند. در این روش DNA استخراج شده از مخلوط جمعیت میکروبی بوسیله ی پرایمر یونیورسال 16srRNA از طریق PCR تکثیر می شود. محصولات بدست آمده از PCR سایز یکسانی دارند و از آنجائیکه در الکتروفورز معمولی با ژل آگارز توالیهای DNA بر اساس اندازه جدا میشوند، بنابراین با آن روش نمیتوان آنها از هم جدا کرد.اما DGGE میتواند قطعات هم اندازه DNA را که متعلق به باکتریهای مختلف هستند بر اساس اختلاف در توالیشان جدا کند. در DGGE محیط دناتوره کننده بوسیله ی ترکیبی از دمای بین ^{o}C ۵۰ تا ۶۰ و شیب خطی مواد دناتوره کننده متشکل از اوره و فرم آمید، ایجاد میشود. شیب محلول دناتوره کننده میتواند به صورت قائم[2] یا موازی[3] با جهت الکتروفورز باشد (شکل۱). در ژل قائم، شیب مواد دناتوره کننده بر جهت الکتریسیته عمود است و معمولا طیف وسیعی مواد دناتوره کننده مورد استفاده قرار میگیرد. در حالیکه در DGGE موازی، شیب مواد دناتوره کننده با مسیر الکتریسیته موازی است و طیف مواد دناتوره کننده محدود است و شرایط برای بهتر دناتوره شدن قطعات فراهم است. دمای ذوب DNA دو رشته ای وابسته به توالی آن است و اگر قطعات DNA کاملا دناتوره شوند، حرکت مجدداً تحت تاثیر اندازه قرار میگیرد. برای جلوگیری از

1. Denaturing gradient gel electrophoresis Polymerase chain reaction -

2. perpendicular
3. parallel

دناتوراسیون کامل قطعات دورشته ای DNA، میتوان یک توالی طویل غنی از گوانین و سیتوزین را به یکی از پرایمرهای PCR اضافه کرد. این توالی (گیره یGC)[1] معمولا ۴۰ باز طول دارد و در انتهای '۵ پرایمر فوروارد[2] قرار میگیرد و به هر امپلیکون تولید شده در PCR ملحق میشود. گیره ی GC از دناتوراسیون کامل محصول PCR در هنگام الکتروفورز DGGE جلوگیری میکند، (۵-۷). ژل حاوی شیب مواد دناتوره کننده بوسیله ی دستگاه سازنده شیب تهیه میشود و در بافری با دمای بین °C ۵۰ تا ۶۰ قرار میگیرد. سپس محصولات PCR درآن بارگذاری شده و الکتروفورز با زمان مناسب انجام میشود.



شکل ۱- A: ژل حاوی ماده دناتوره کننده به صورت قائم B: ژل حاوی ماده دناتوره کننده به صورت موازی

کاربرد تکنیک PCR-DGGE در میکروبیولوژی

تاکنون چندین نوع از الکتروفورز همراه با شیب مواد دناتوره کننده برای توصیف جمعیت میکروبی معرفی شده است. در میان این تکنیکها، DGGE یکی از روشهای معمول و پرکاربرد حاضر است.

PCR-DGGE ابزاری مناسب برای نشان دادن تفاوت های ژنتیکی میکروبها فراهم میکند، این روش ارزیابی حداقلی از اعضای غالب جمعیت میکروبی بدست میدهد. علاوه بر این DGGE امکان شناسایی جمعیتهای خاص را، از طریق آنالیز هیبریداسیون الگوها با پروبهای خاص و یا از طریق تعیین توالی باندهای خاص، فراهم میکند (۷). DGGE یک تکنیک مولکولی برای آنالیز سریع ترکیب جمعیت، تنوع و دینامیک میکروبی است. این تکنیک سریع و کار آمد است و اجازه میدهد که چندین نمونه به صورت همزمان بررسی شوند. DGGE میتواند نمایشی فوری از اجزاء میکروبی محیط فراهم کند و علاوه بر این در مقایسه با توالی یابی کمتر وقتگیر و پرزحمت است. مرحله DGGE به غیر از بافر و پلی آکریل آمید مورد نیاز برای ساختن ژل، هزینه زیادی نمی برد. توانایی بررسی چندین نمونه به طور همزمان، امتیاز DGGE از لحاظ اقتصادی است (۵). کاربرد DGGE در میکروبیولوژی، ابتدا در اکولوژی میکروبی توسط Muyzer و همکارانش در سال ۱۹۹۳ پایه گذاری شد. علی رغم اینکه آنالیز توالی به صورت ارزان و دارای عملکرد بالا سریعاً گسترش پیدا کرده است، کاربرد DGGE به عنوان یک جزء مهم در آنالیز های اکتشافی و تجربی جمعیت های میکروبی همچنان ادامه دارد. (۸ و ۹).

محدودیت های تکنیک PCR-DGGE در میکروبیولوژی و راهکارهای غلبه بر آن

این روش دارای چندین محدودیت ذاتی و بالقوه میباشد. کشف DNA هدفی که کمتر از ٪۱ کل مخزن هدف باشد توسط DGGE امکانپذیر نیست. همچنین آنالیز DGGE تنها برای نشان دادن ارگانیسم های غالب یا فیلوتایپ های یک جمعیت در نظر گرفته میشود. هنگام بررسی محیط هایی که تنوع میکروارگانیسم بالایی دارند، باند های بدست آمده ممکن است همیشه قابل تشخیص نباشند. زیرا ممکن است اسمیر و یا الگویی از باند ها تشکیل شوند

1. GC-clamp
2. Forward

که به راحتی قابل تفکیک نباشند. تفاوت الگوی باند ها در یک ژل با ژل دیگر، امکان مهاجرت همزمان مولکول های DNA دارای توالی های متفاوت و باند های بالقوه متعدد ناشی از اپرونهای متغیر ژن 16srRNA که از ارگانیسم واحدی منشاء گرفته اند، بر محدودیت های این تکنیک می افزاید. از آنجائیکه این روش همراه با PCR است، ضعف هایی که با PCR همراه هستند نیز به این آنالیزها اضافه می شوند. برای غلبه بر این نقص های بالقوه و واقعی، استفاده از DGGEبه عنوان ابزاری برای آنالیز جمعیتهای میکروبی همراه با تکنیکهای جانبی رشد کرده است. Neufeld و Mohn در سال ۲۰۰۵ پرایمر های نشاندار شده با فلوئوروفور را برای بهنجار کردن نتایج DGGE در درون ژل به کار بردند. در دسترس بودن یک نرم افزار برای مقایسه ی پروفایلهای DGGE به منظور آنالیز خوشه ای، توانایی مقایسه نتایج DGGE را قوت داده و همچنین اضافه کردن نتایج DGGE به سایر داده ها را راحت تر کرده است (۱۰). در مورد توالی یابی از طریق DGGE، بسیاری از نگرانیها در مورد طول کم توالیهای مورد استفاده در DGGE میباشد. پیشرفت های اخیر در آنالیز توالی ژن 16srRNA نشان داده که اطلاعات بدست آمده از ۲۵۰ جفت باز در ناحیه ی مناسب ژن 16srRNA برای شناسایی کافی است (۱۱). با افزایش استفاده از تکنیک های توالی یابی مانند آنالیز پی در پی tag های توالی های ریبوزومی و پیروسکانس[1]، به نظر میرسد این محدودیت DGGE کمتر از قبل مشکل زا است (۱۲و۱۳). به منظور بدست آوردن پروفایل جمعیت همراه با اطلاعات فیلوژنتیک جمعیت، آنالیز نتایج DGGE در کنار آنالیز کتابخانه کلون از نمونه های انتخاب شده قرار میگیرد. با استفاده از PCR آشیانه[2] میتوان به مشکل کمبود DNA هدف در یک جمعیت غلبه کرد (۱۴و۱۵). DGGE برای تجزیه و تحلیل نمونه هایی با تنوع میکروبی نسبتاً پایین عملی تر است. با این حال، برخی تحقیقات به طور موفقیت آمیزی DGGE را برای مقایسه جمعیت های میکروبی پیچیده مانند نمونه خاک زراعتی به کار گرفته اند(۱۶). علاوه بر این زمانیکه تنوع بالای جمعیت جلوی تفکیک واضح DNA میکروبی را میگیرد و یا اینکه جمعیت مورد نظر ما کمتر از ۱٪ کل جمعیت را شامل میشود، استفاده از پرایمر های ویژه تاکسون، به منظور متمرکز شدن بر روی یک گروه تاکسونومیک خاص کمک میکند (۱۷).

بحث و نتیجه گیری

با گذشت چندین سال از مطرح شدن تکنیک DGGEبرای آنالیز جمعیت میکروبی مطالعات زیادی کاربرد ها، جزئیات و معایب این تکنیک را به رشته تحریر درآورده اند. اگرچه تکنیک DGGE انتخاب مناسبی برای شناسایی کامل جمعیت های میکروبی و به منظور بررسی تنوع میکروبی نیست، این تکنیک برای غربالگری اولیه به منظور مقایسه نمونه های مختلف و همچنین برای آنالیز توالی های DNA جداشده، ایده آل است. در برخی مطالعات انجام شده بر روی نمونه هایی با تنوع میکروبی کم، باندهای جدا شده توسط DGGE توالی یابی شده و مورد شناسایی قرار گرفته اند (۱۸). در حالیکه در مورد نمونه های دارای تنوع میکروبی بالا از این تکنیک برای مشاهده میکروارگانیسم غالب و مقایسه پروفایل میکروبی استفاده شده است. این تکنیک در زمینه های مختلف علم میکروبیولوژی مانند: میکروبیولوژی پزشکی، میکروبیولوژی غذایی، میکروبیولوژی محیطی و میکروبیولوژی صنعتی به کار رفته است (۱۹). در حال حاضر فاکتور های اصلی که کاربرد DGGE را محدود میکند شامل موارد زیر میباشند: مشکل در استاندارد

1. Pyrosequecing
2. Nested PCR

سازی آزمایشگاه به آزمایشگاه (مانند شرایط راه اندازی دستگاه، مقدار DNA بارگذاری شده و...) مشکل در استاندارد سازی ژل به ژل، ارتباط ضعیف بین تنوع بدست آمده از DGGE و تنوع اندازه گیری شده از طریق کلون کردن، عدم تایید *In situ* در مورد ارگانیسم های غالب بدست آمده از طریق DGGE، کاربرد های نامناسب DGGE (مثلا برای آنالیز کامل و اندازه گیری تنوع نمونه هایی با تنوع زیاد) و کاربرد ژل هایی با کیفیت ضعیف برای عکسبرداری و آنالیز های بعدی مانند آنالیز جزء اصلی. برخی مقالات (مانند Sanchez 2007)، پرایمرهای مورد استفاده برای آنالیز جمعیت های باکتریایی و آرکی باکتری ها توسط DGGE را مقایسه کرده است (۲۰). چنانچه پرایمرهای مورد استفاده و شرایط انجام DGGE به طور جداگانه برای باکتریها، آرکی باکتر ها و یوکاریوت ها مشخص شود، با ایجاد هماهنگی در انجام تحقیقات، مقایسه نتایج مرتبط قابل اطمینان تر خواهد بود.

منابع و مآخذ

1. Mohammadi P, Tavakoli A, Asgarani E, Ghazanfari T, Soroush MR. Identification of dominant bacteria in sputum of chemical injured patients by using PCR-DGGE technique and culture-dependent method. IJIDTM. 2015; 68: 7-14.[in Persian]
2. Fischer SG and Lerman LS. Length-independent separation of DNA restriction fragments in 2-dimensional gel-electrophoresis. Cell.1979; 16:191-200.
3. Fischer SG Lerman. LS.Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences .Proc Natl Acad Sci U S A.1980; 77: 4420-4424.
4. Fischer SG and Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels correspondence with melting theory .Proc Natl Acad Sci U S A.1983; 80:1579-1583.
5. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden. AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol.1993; 59: 695-700.
6. Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. Methods Enzymol. 1987;155: 501-27.
7. Schafe. H and Muyzer G. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis in marine microbial ecology, Methods in microbiology. 2001; 30: 425-68.
8. Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. Nature. 2000; 403: 646-9.
9. Neufeld JD, Vohra J, Dumont MG, Lueders T, Manefield M, Friedrich MW, Murrell. JC .DNA stable-isotope probing. Nat Protoc. 2007; 2: 860-6.
10. Green SJ, Leigh MB, Neufeld JD. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis, Germany: Springer; 2009. P. 4137-58.
11. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. A naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl Environ Microbiol. 2007; 73 (16): 5261-7.
12. Neufeld JD, Yu Z, Lam W, Mohn WW. Serial analysis of ribosomal sequence tags (SARST): a high-throughput method for profiling complex microbial communities. Environ Microbiol. 2004. 6 :131-44.
13. Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. ISME J. 2007; 1 : 283-290.
14. Green SJ, Michel FC, Hadar Y, Minz D. Contrasting patterns of seed and root colonization by bacteria from the genus *Chryseobacterium* and from the family Oxalobacteraceae. ISME J. 2007; 1: 291-299.
15. Dar SA, Kuenen JG, Muyzer G. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. Appl Environ Microbiol. 2005; 71: 2325-30.
16. Edenborn LS, Sexstone JA. DGGE fingerprinting of culturable soli bacterial communities complements culture–independent analyses Soil Biol Biochem. 2007. 39: 1570-9.
17. Muhling M, Woolven-Allen J, Murrell JC, Joint I. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. ISME J. 2008. 2: 379-92.
18. Power DA, Burton PG, Chilcott NC, Tagg RG, Dawes JP. Non-Culture-Based Analysis of Bacterial Populations from Patients with Chronic Rhinosinusitis. J. Clin. Microbiol. 2005; 43(11): 5822-4.

19. Liu T, Jia T, Chen J, Liu X, Zhao M, Liu P. Analysis of microbial diversty in shenqu with different fermentation times by PCR-DGGE. Braz J Microbiol. 2017; 48(2):246-250.

20. Sanchez O, Gasol JM, Massana R, Mas J, Pedros-Alio C. Comparison of different denaturing gradient gel electrophoresis primer 705 sets for the study of marine bacterioplankton communities .Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73: 59-62-67.