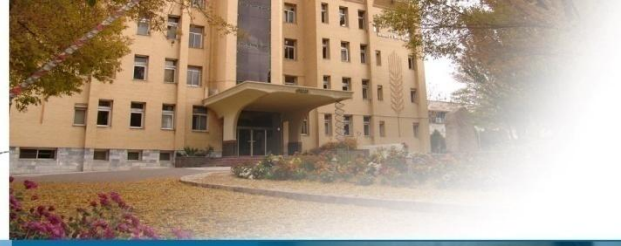
بسم الله

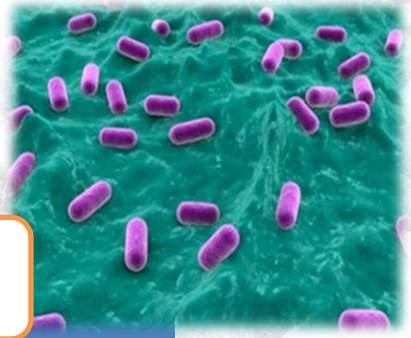
Agricultural Biotechnology Research Institute of IRAN



National Congress of Probiotic and

روش ها و پیشرفت ها در شناسایی مولکولی باکتری های پروبیوتیک

محمد امین حجازی



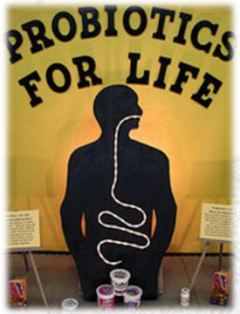
مقدمه

خصوصيات پروبيوتيكي وابسته به سويه است، به همين دليل شناسايي در حد فراتر از جنس و گونه يعني سطح سويه در پروبيوتيك هاي جداسازي شده الزامي مي باشد.

هدف از اين مقاله اشاره به روش هاي مختلف مولكولي مورد استفاده در زمينه پروبيوتيك ها و ذكر فعاليت هاي تحقيقاتي پژوهشكده بيوتكنولوژي كشاورزي شمالغرب و غرب كشور در اين زمينه مي باشد.

ضرورت شناسایی دقیق پروبیوتیک ها

-اهمیت شناسايي سويه جهت ارجاع آن در مطالعات اپيدميولوژيكي
-اهمیت شناسايي دقيق سويه ها و تاييد عدم وجود ژنهاي مقاومت به آنتي بيوتيك ها
-اهمیت شناسايي دقيق پروبيوتيك ها در بررسي زنده ماني در طول فرآيند و نگهداري محصول پس از توليد



Supplement Facts

Serving Size 1 Capsule — Servings Per Container 60

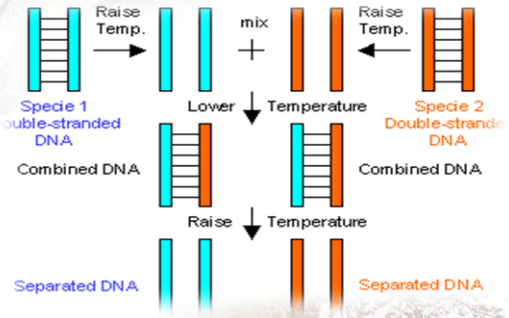
	Amount Per Serving	% DV
Probiotic Blend	10 Billion Organisms	*
L. acidophilus LA-02	*L. rhamnosus* LR-04	
L. paracasei LPC-00	*B. lactis* BS-01	
L. plantarum LP-01	*B. breve* BR-03	

* Daily Value not established.

مروری بر روش های مولکولی در شناسایی پروبیوتیک ها

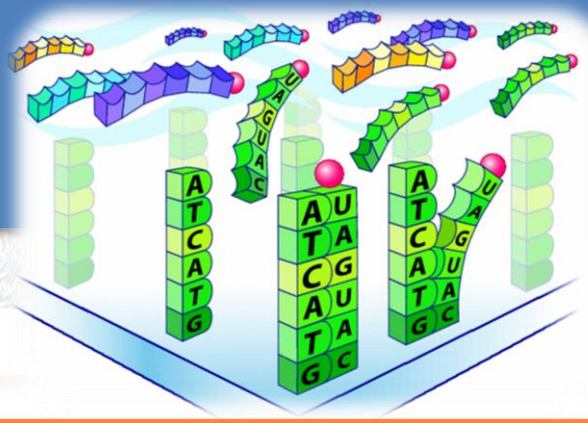
۱. هیبریداسیون DNA-DNA:

- ✓ هیبریداسیون ما بین سویه های مشابه اجرا می شود
- ✓ مقایسه همولوژی مابین دو توالی DNA بر اساس درصد جفت شدن نوکلئوتیدها استفاده می گردد (لون واد و همکاران، ۱۹۹۱).



۱- هیبریداسیون DNA-DNA

- ✓ به عنوان روش استاندارد طلائی برای تشخیص باکتری‌ها
- ✓ دو سویه وقتی متعلق به یک گونه معرفی می شود که ارتباط DNA-DNA آنها ۷۰درصد یا بیشتر گزارش شود.
- ✓ اجرای روش بسیار سخت و گران بوده و برای تشخیص در مقیاس وسیع مناسب نیست.



۲. استفاده از توالي نواحي حفاظت شده

۱- بررسی توالی ITS، 16S-23S و 16S rRNA (روسي و همكاران، ۲۰۰۱).

۲- وجود بیش از ۹۷ درصد همولوژی بین دو باكتري از نظر توالی 16S rRNA متعلق به يك گونه هستند.

۳- عدم وضوح كافی برای تشخیص گونه های خیلی نزدیک (***لاکتوباسیلوس دلبروکی، کازئی و پلانتاروم***)

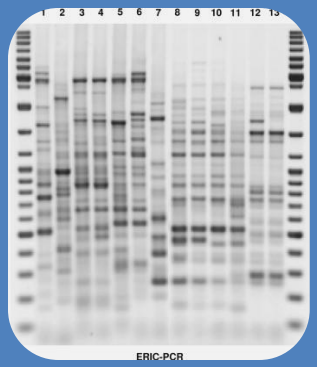
رفع این مشکل: تکمیل اطلاعات با توالی یابی ژنهای مهم کدکننده پروتئینهای دیگر

۳. استفاده از پرایمرهای اختصاصی یا غیراختصاصی جهت تکثیر نواحی مختلف ژنوم

- ✓ روشهای RAPD-PCR, rep-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR(دبروین، ۱۹۹۲؛ لاوس و همکاران، ۱۹۹۴، گورس و همکاران، ۲۰۰۱؛ برتیر و اهرلیچ، ۱۹۹۹؛ اندریگتو و همکاران، ۲۰۰۱)
- ✓ تکثیر به صورت اختیاری و غیر اختصاصی

عیب روش:

- ✓ تغییر الگوی الکتروفورزی با ایجاد تغییرات در مراحل PCR
- ✓ عدم تکرار پذیری نتایج در بین آزمایشگاههای مختلف

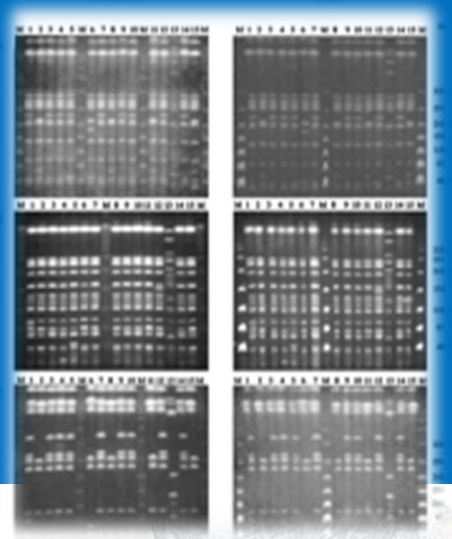


رفع این مشکلات با معرفی روش AFLP (وس و همکاران، ۱۹۹۵) :

- ❑ هیدورلیز DNA با دو نوع آنزیمی برشی
- ❑ اتصال ادابتورها به محصولات PCR
- ❑ طراحی پرایمرها بر اساس ادابتورها کار را اختصاصی تر می کند.

۴. روش Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

- ✓ هیدرولیز DNA کروموزومی با آنزیمهای برشی
- ✓ تفکیک قطعات بلند DNAحاصل با الکتروفورز و پالسهای الکتریکی در دو جهت متفاوت



عیب روش :

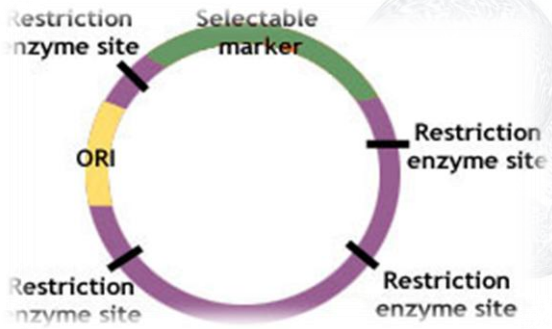
- ✓ اجرای روش بسیار مشکل
- ✓ هیدرولیز ناقص دیواره باکتریها جهت رهاسازی DNA
- ✓ تغییرات ایجاد شده در پالسهای الکتریکی
- ✓ هیدرولیز ناقص آنزیمهای برشی
- ✓ تغییر شرایط الکتروفورز

۵– استفاده از عناصر غير كروموزومی (پلاسميدها)

- ✓ پلاسميدهاDNA ي خارج كروموزومي اند كه به طور مستقل همانندسازي مي كنند.

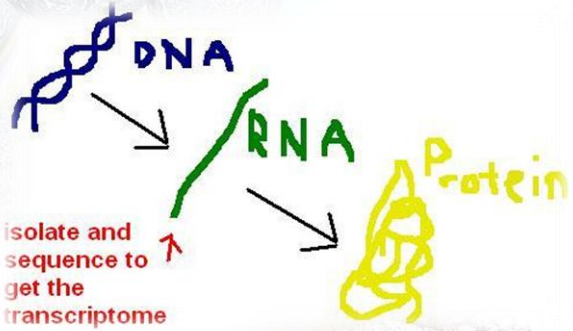
كد كننده عمكلردهاي مهم مانند :

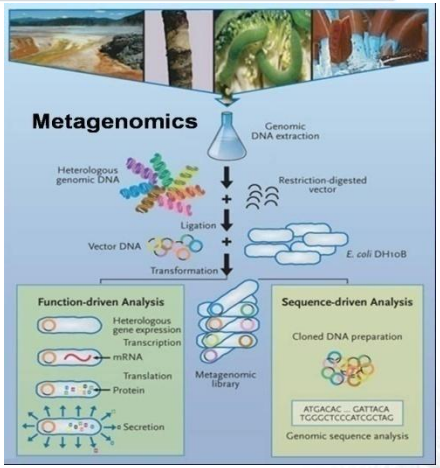
- ✓ مقاومت به آنتي‌بيوتيك‌ها
- ✓ قابليت انتقال پلاسميد به باكتري ديگر
- ✓ توليد آنتي بيوتيك در باكتري استرپتومايسس و برخي صفات بيوشيميايي توسط پلاسميدها كد مي‌شود (سگلي و كلول، ۲۰۰۴)



۶. روش ترانسکریپتوم

- ✓ شناخت دقيق ترنسكريپتوم باكتري‌ها بينش بهتري نسبت به عملكرد و تنظيم ژن فراهم مي‌آورد.
- ✓ پاسالاكوا و همكاران در سال ۲۰۰۹ ترنسكريپتوم *Bacillus anthracis* را استخراج و نقشه صحيح با قدرت تفكيك بالا از نواحي آغاز رونويسي و ساختار اپرون در سرتاسر ژنوم را به دست آوردند.





۶. روش مطالعات متاژنومیکسی

- ✓ یکی از روش های مدرن
- ✓ روش شامل استخری از ژنوم میکروبیوم های مختلف است.
- ✓ در مواردی که با تکثیر قطعات با PCR و کلونینگ نتوان به شناسایی DNA گونه های باکتریایی پرداخت از روش متاژنومیک جهت تشخیص تجمعات باکتریایی بدون استفاده از کشتهای باکتریایی و تکثیر با PCR استفاده می شود. (پتروسینو و همکاران، ۲۰۰۹).

۷. روش پروبیوژنومیکس (Probiogenomics)

- ✓ پروبیوژنومیکس اصطلاحی است که در مورد توالی یابی کل ژنوم باکتریهای پروبیوتیک مطرح شده است.
- ✓ این روش به عنوان استراتژی جدید جهت ایجاد بینش و دیدگاه های جدید در مورد تنوع عملکردی ، مکانیسمهای بهبود دهنده سلامتی و تکامل پروبیوتیکها استفاده شده است.
- ✓ بیشتر تحقیقات مربوط به دو جنس لاکتوباسیلوسها و بیفیدوباکتر می باشد. (ونتورا و همکاران، ۲۰۱۲).

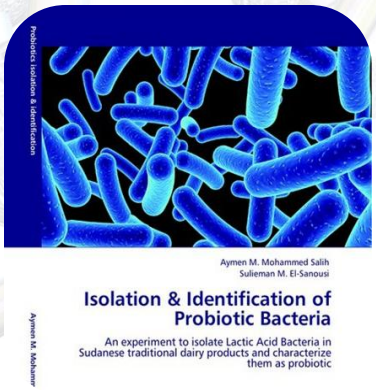
فعالیت های تحقیقاتی در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور

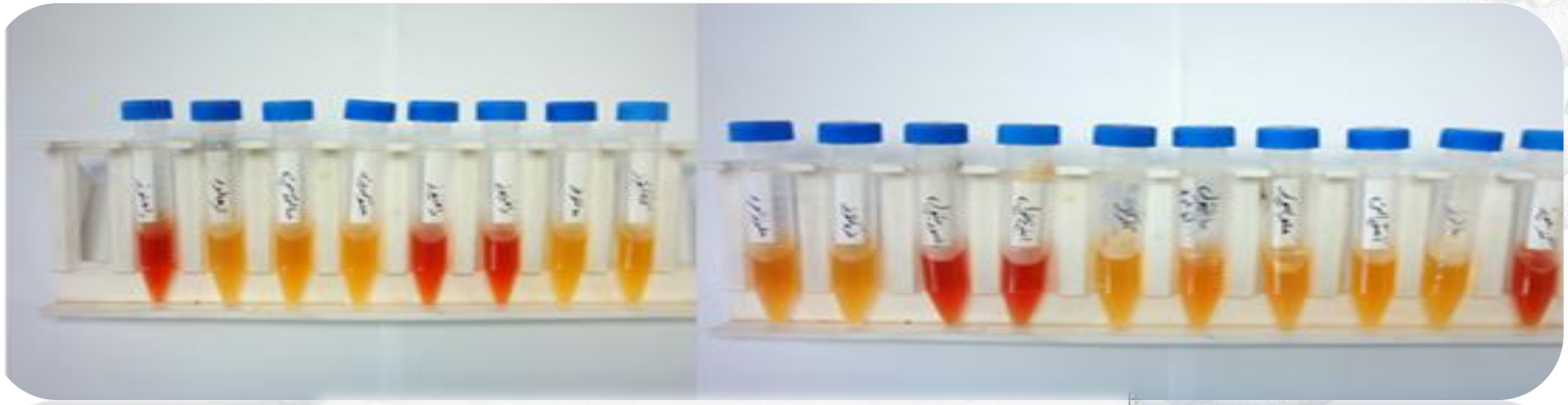
۱. شناسایی ایزوله ها با روش های بیوشیمیایی

باكتري پروبيوتيك از محصولات لبني محلي و ديگر فراورده هاي تخميري سنتي جداسازي شده و در بانك سلولي پژوهشكده بيوتكنولوژي كشاورزي شمالغرب و غرب كشور نگهداري مي‌گردند.

شناسايي اوليه اين ايزوله‌ها براساس خصوصيات بيوشيميايي شامل :

- ✓ رشد در دماهاي مختلف
- ✓ رشد در pH هاي مختلف
- ✓ رشد در درصدهاي مختلف نمك
- ✓ تعيين الگوي تخميري كربوهيدرات ها





سویه ها / آزمونها	E3	E10	E12	E13	E14	E15	E16	E19	E20	E21	E22	E23	E24	E29	E30	E31
تست کاتالاز	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
رشد در دمای ۱۰ درجه	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
رشد در دمای ۴۵ درجه	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در نمک ۶/۵٪	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در نمک ۴٪	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در PH=4/4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
رشد در pH=9/6	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
آمیگدالین	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
آرابینوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سلوبیوز	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
فروکتوز	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
گالاکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
گلوکز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

گروه بندی جدایه های لاکتوباسیلوس بر اساس شباهت جدایه ها به گونه های متفاوت لاکتوباسیلوس و شناسایی مولکولی آنها

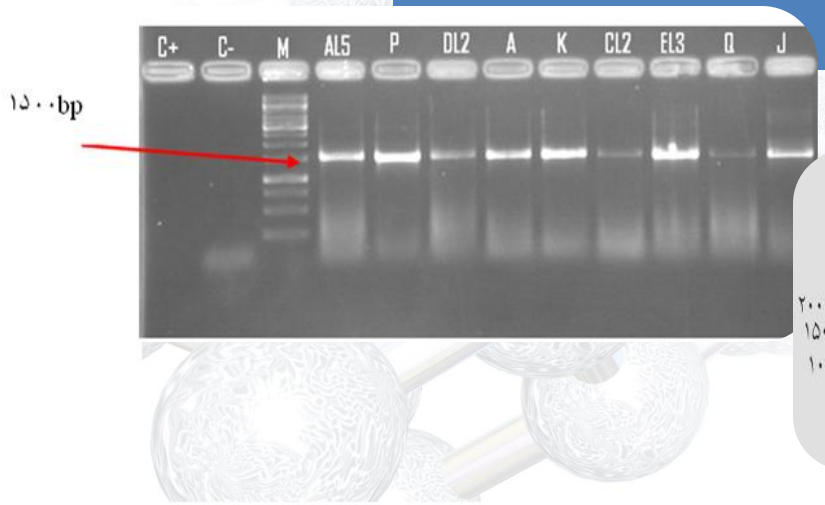
جدایه	شباهت به گونه های لاکتوباسیلوس بر اساس تستهای بیوشیمیایی	جدایه کاندید جهت توالی یابی	شناسایی مولکولی
L2-L3-L26-L5-L6-L9-L11-L17-L18-L7-L8-C1D2-Y1L4-Y2F3-Y2C4-Y2P3-Y1M4-Y2N2-Y2L6- AL2-AL5-AL7-CL3- EL2-C6M3	کازئی – مالتارومیکوس- ساکی	C6M3	کازئی
GL1(H)-EL1(J)-EL2(C)- CL1(O)-GL3(R)-IL3(T)- L1-L4 -EL3 -AL1(I)	بوشنری- برویس- رئوتری- فرمنتوم	EL1(J)	L.sp
		EL3	برویس
		AL1(I)	برویس
AL2(P)-CL1- AL3(A)- BL2(B)-CL3- C6L2	اسیدوفیلوس- دلبروکی- برویس	AL2(P)	برویس
		CL3	برویس
		C6L2	برویس
EL3(Q)-C4L2-K2L3-C5L4-D3B1-Y2B10-C6M1-C2H1-K1L4-Y2B9- L25-L27-L28-BL1- BL2-BL4-CL2- AL3-AL4-AL6-AL8-DL2-BL3-DL1-DL3-EL1- AL1	پلانتاروم – آژیلیس- مورینوس	L28	پلانتاروم
		CL2	پلانتاروم
		BL3	پلانتاروم
		DL3	پلانتاروم
		AL1	پلانتاروم

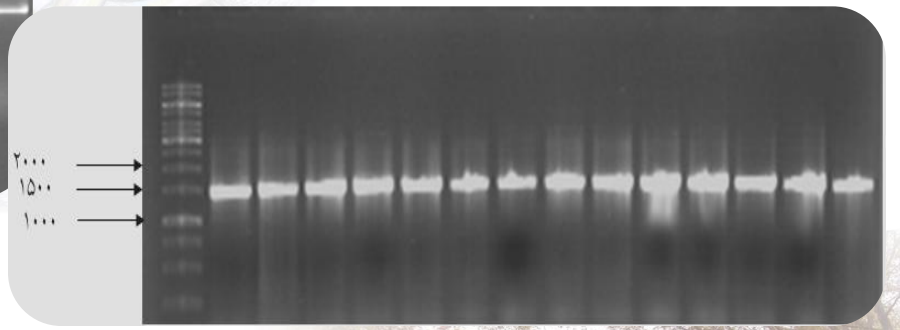
استفاده از روشهای مولکولی

۱. روش‌هاي PCR براساس ژن‌هاي حفاظت شده از جمله ۱۶S rDNA
۲. نشانگرهاي مولكولي RAPD
۳. روش ARDRA
۴. روش كلونينگ ژن ۱۶S rDNA
۵. توالي يابي ژن ۱۶S rDNA
۶. مطالعات متاژنومي (در حال اجرا)

۱. روش‌هاي PCR براساس ژن‌هاي حفاظت شده از جمله16S rDNA

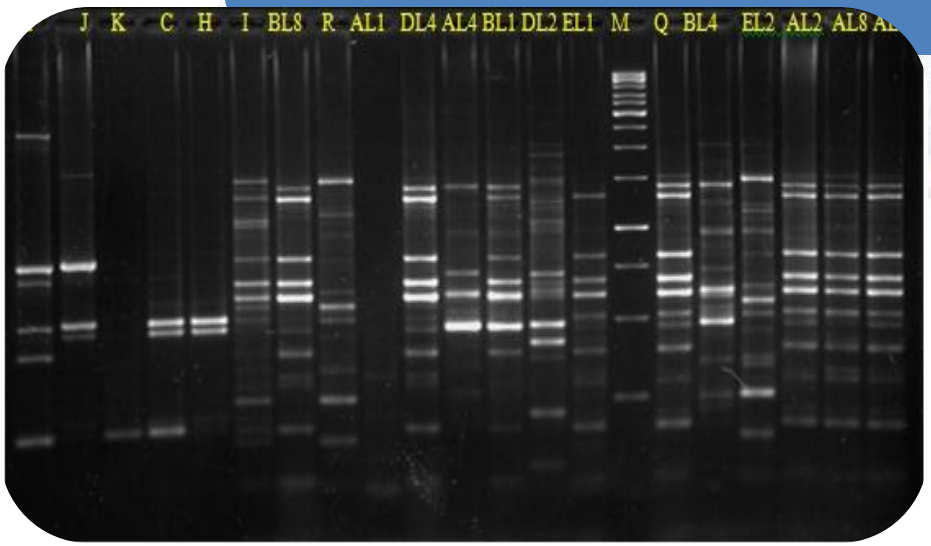
- ✓ استفاده از پرايمرهاي اختصاصي
- ✓ الكتروفورز روي ژل آگارز
- ✓ ايجاد باند مورد نظر در اندازه ۱۵۰۰ نوكلئوتيد

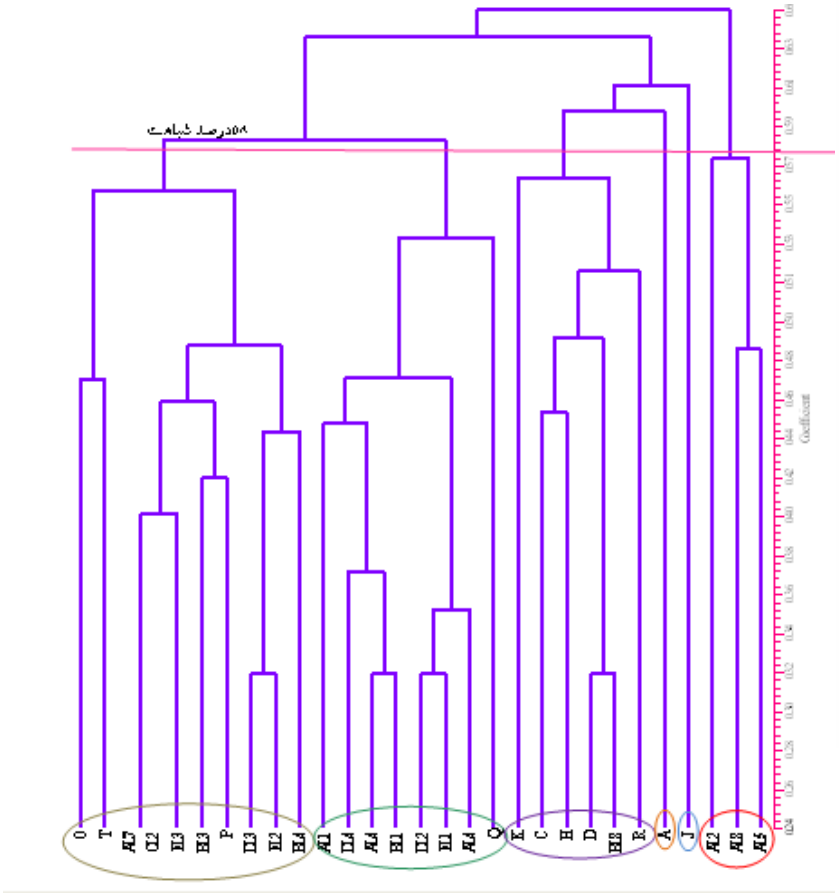


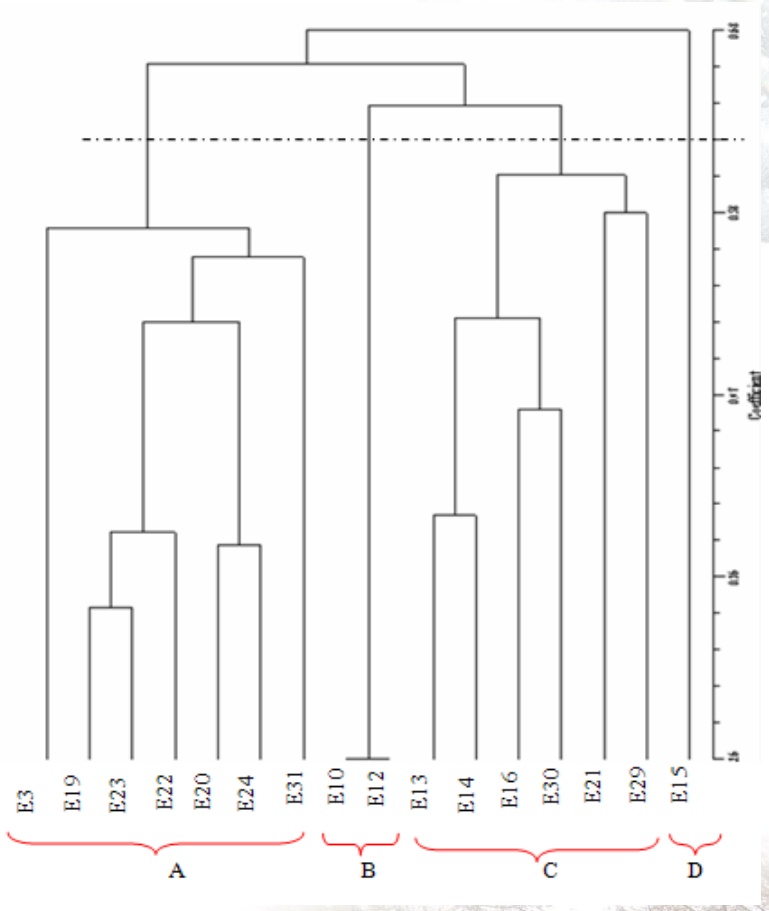


2. نشانگرهای مولکولی RAPD

- استفاده از پرايمرهاي نيمه اختصاصي (p10, p8, B7, B10, oPFo2)
- الكتروفورز روي ژل آگارز
- اسكوردهي با برنامه ntsys (وجود و عدم وجود باند)
- گروه بندي ايزوله ها

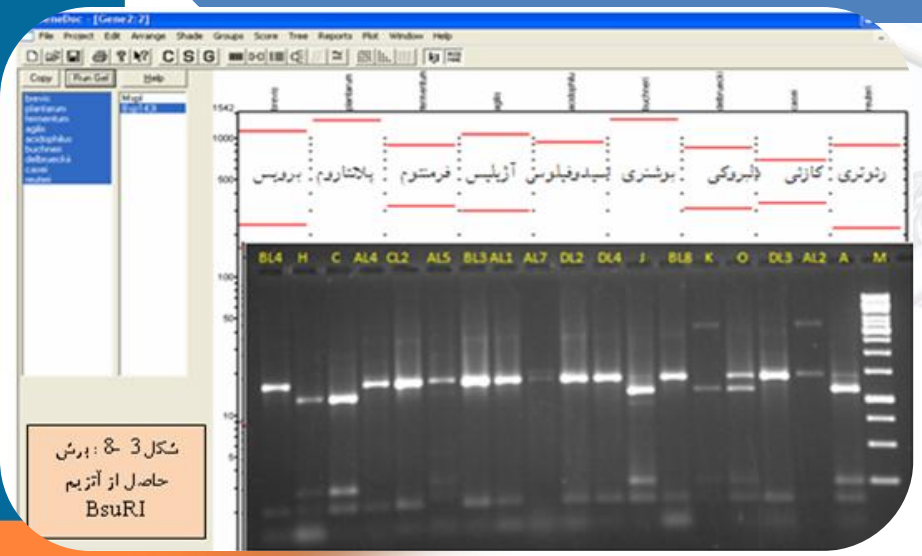



۵۸درصد تشابهت
Coefficient

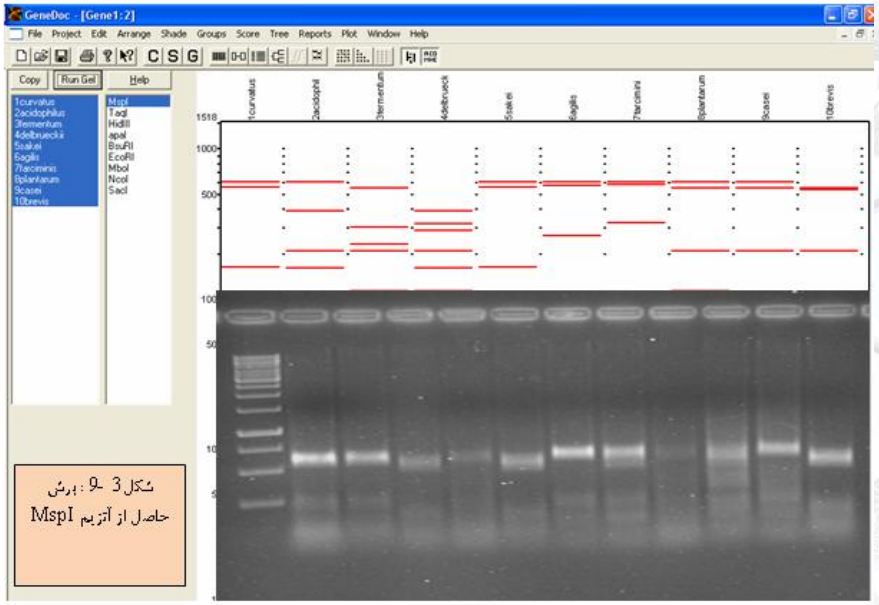

E3
E19
E23
E22
E20
E24
E31
E10
E12
E13
E14
E16
E30
E21
E29
E15
A
B
C
D
Coefficient

3. روش ARDRA

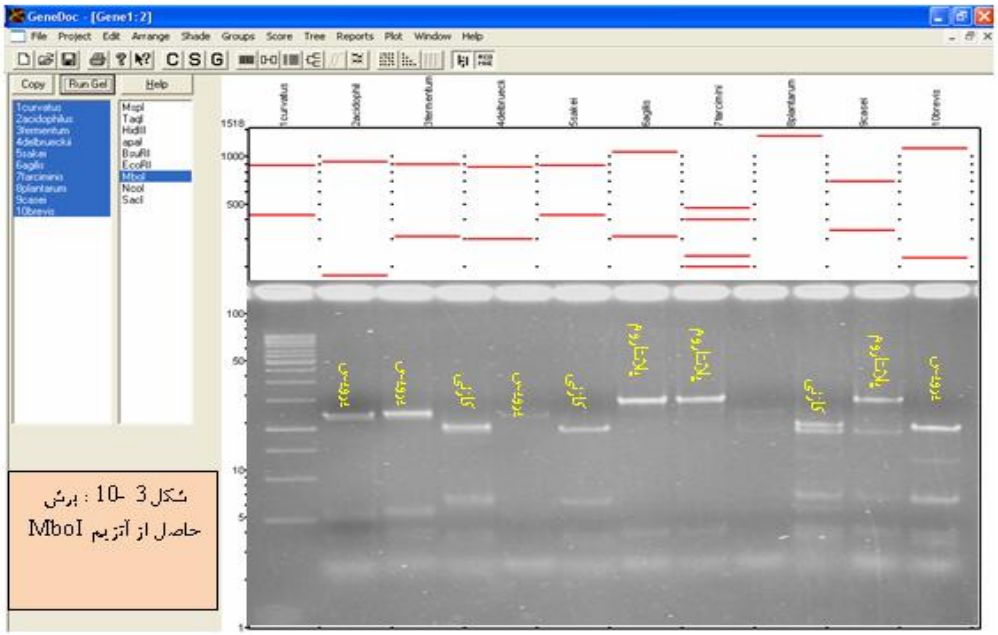
- ✓ استفاده از آنزيمهاي برشي (TaqI، MspI ، HindIII ، Bsp143I ، BsuRI ، MboI)
- ✓ مقايسه برشهاي حاصل با برنامه GenDoc
- ✓ تشخيص گونه هايي كه با روشهاي بيوشيميايي و RAPD قابل تفكيك نبودند.



شکل 3 -8 : برش حاصل از آنزیم BsuRI

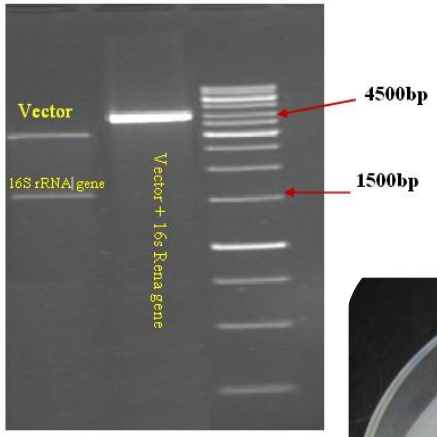


شکل 3 -9 : برش حاصل از آنزیم MspI

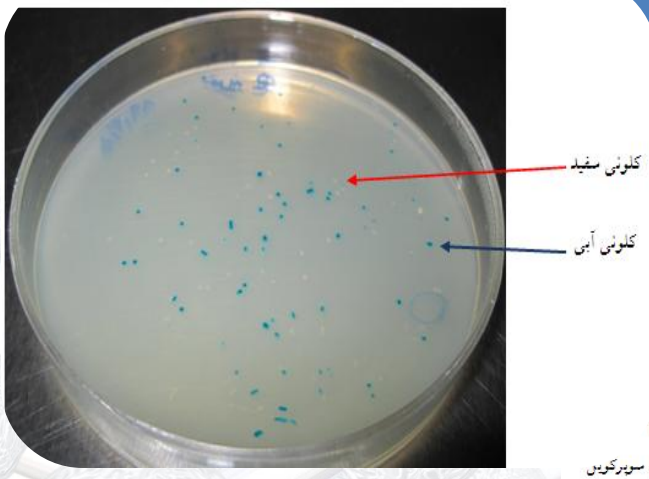


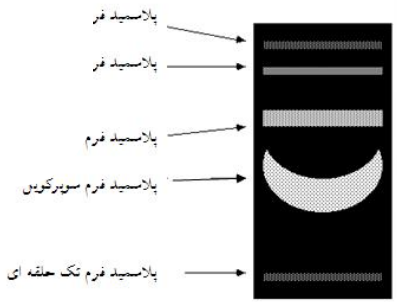
شکل 3 -10 : برش حاصل از آنزیم MboI

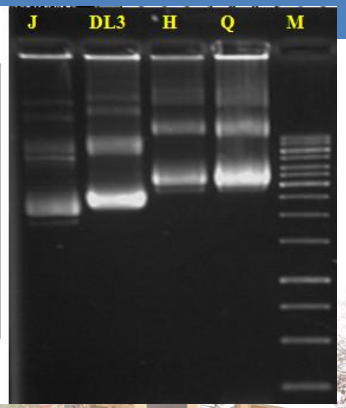
۴. روش کلونینگ ژن 16S rDNA



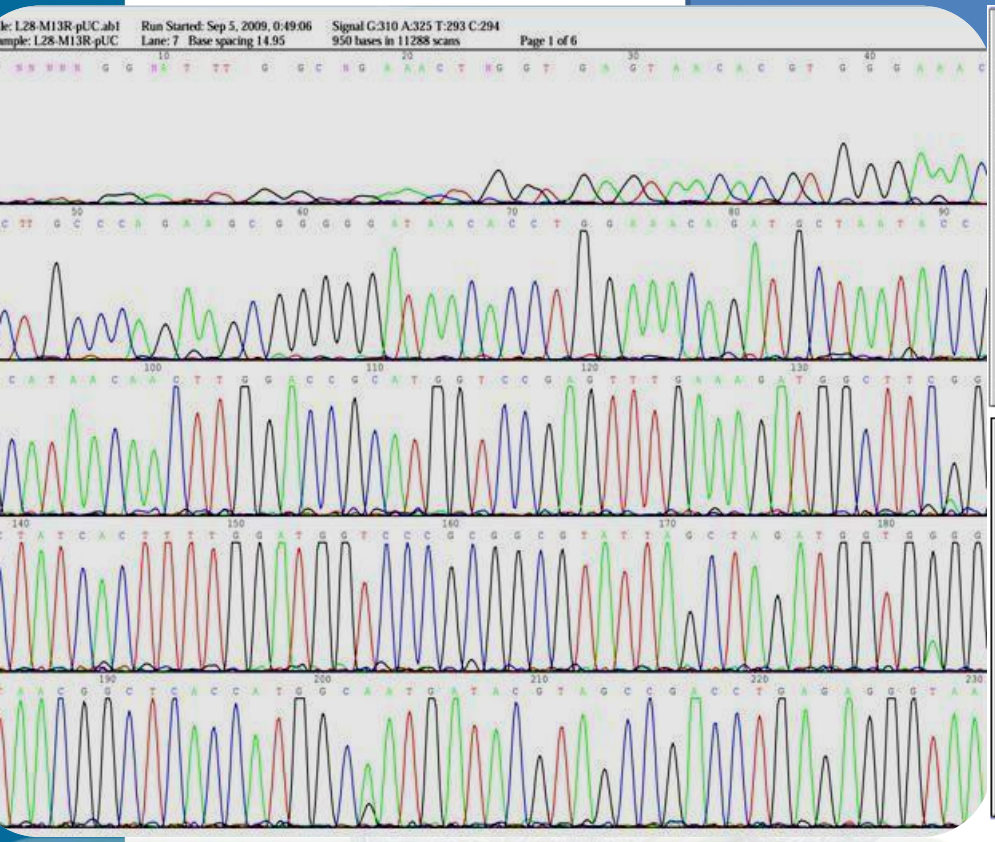
- ✓ استفاده از روش T/A cloning
- ✓ استفاده از وکتور pGEM
- ✓ ارسال برای توالی یابی

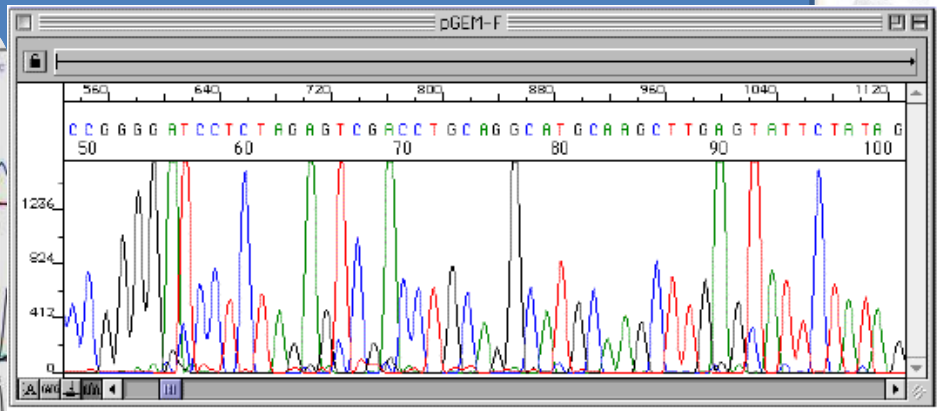


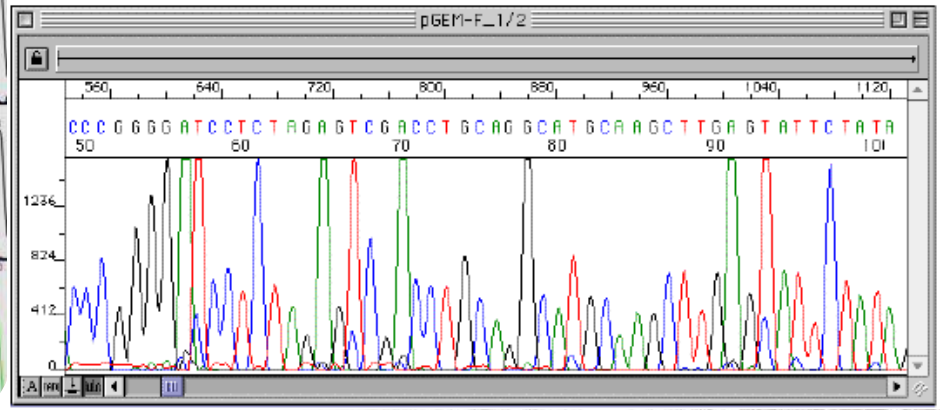


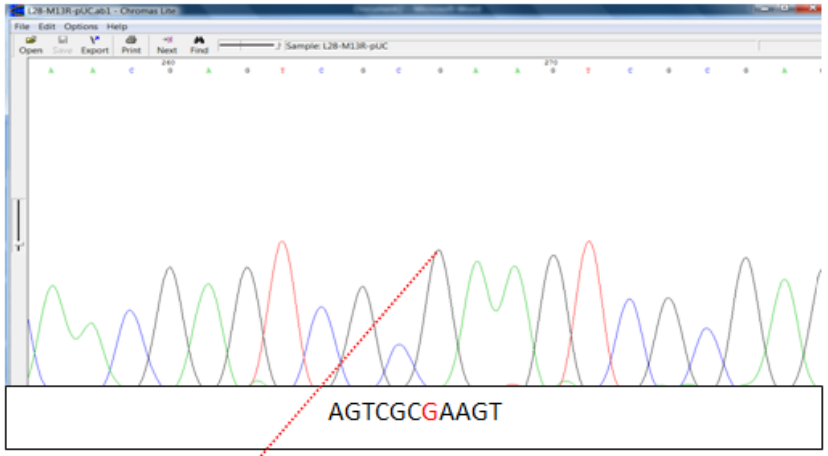


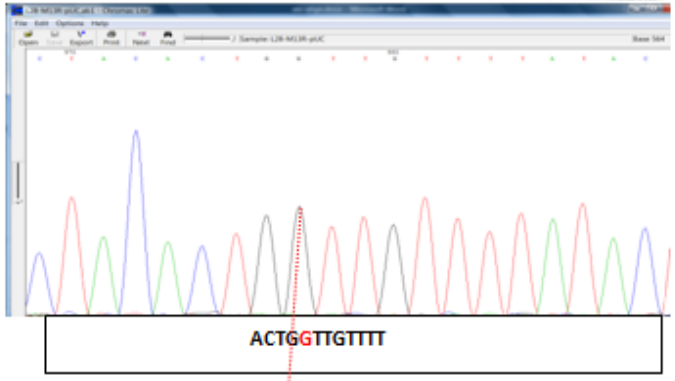
۶. توالی یابی ژن 16S rDNA







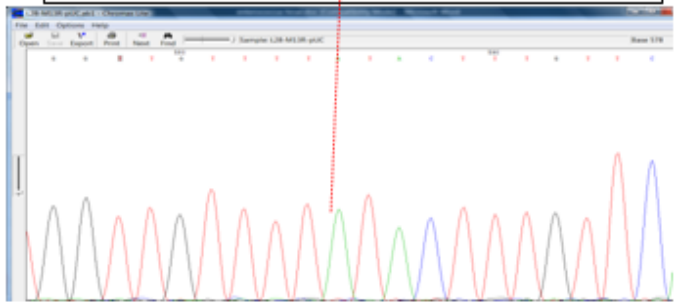





```
Query  1499  GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGG  1558
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1497  GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAAGG  1556

Query  1559  AATATTACGGAGACTACACTGGTTGTTTTAT-ACTTTGTTCAGTTTTGAGAGGTCTACTC  1617
             |||||||||||||||||||| |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1557  AATATTACGGAGACTACACTGTTTGTTTT-TCACTTTGTTCAGTTTTGAGAGGTCTACTC  1615
```

TTTTAT-ACTTT



```
Query  1259  CAACGAGTCGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATT  13
             ||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1257  CAACGAGTCGCAAAGTCGCGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATT  13

Query  1319  GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCG  13
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1317  GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCG  13
```

۷- مطالعات متاژنومی (در حال اجرا)

- مطالعه متاژنومي جهت بررسي جمعيت باكتري‌هاي اسيد لاكتيك در شير تحت تيمار باكتري هاي پروبيوتيك و نيز در پنير سنتي لبني در طول دوره رسيدن و نگهداري نيز در حال انجام است

نتيجه گيري كلي

ردیف	نمونه	شناسایی بر اساس توالی یابی	Accesion number
۱	AL1((ماست کلیبر	لاکتوباسیلوس برویس	HM854726.1
۲	EL3 (ماست کلیبر)	لاکتوباسیلوس برویس	JN368472.1
۳	DL3 (ماست اهر)	لاکتوباسیلوس پلانتاروم	HQ406829.1
۴	CL2 (کشک اهر)	لاکتوباسیلوس پلانتاروم	HQ610929.1
۵	BL1 (ماست کلیبر)	*Lactobacillus*.sp	HQ406830.1
۶	AL1(پنیر ماکو)	لاکتوباسیلوس پلانتاروم	JN368470.1
۷	BL3 (پنیر اهر)	لاکتوباسیلوس پلانتاروم	JN368469.1
۸	L28 (پنیر سراب)	لاکتوباسیلوس پلانتاروم	HQ661099.1
۹	CL3 (کشک اهر)	لاکتوباسیلوس برویس	JN368471.1
۱۰	AL2 (ماست کلیبر)	لاکتوباسیلوس برویس	JN368473.1
۱۱	C6M3	لاکتوباسیلوس کازئی	JN383919.1
۱۲	C6L2	لاکتوباسیلوس برویس	JN383920.1
۱۳	DE1 (پنیر کلیبر)	انتروکوکوس دورانس	JQ366081.1
۱۴	IE1 (پنیر کلیبر)	انتروکوکوس فکالیس	JQ366080.1
۱۵	FE1 (پنیر کلیبر)	انتروکوکوس فسیوم	JQ366083.1
۱۶	IE2 (پنیر کلیبر)	انتروکوکوس فسیوم	JQ366084.1
۱۷	E29 (پنیر هریس)	*Enterococcus* sp.	GU064910.1

ایجاد بزرگترین بانک باکتریهای اسید لاکتیک کشور

- پس از چندین سال انجام پروژه های تحقیقاتی هم اکنون بزرگترین بانک باکتریهای اسید لاکتیک کشور با بیش از ۷۰۰ باکتری اسید لاکتیک از مناطق مختلف کشور و کشورهای همسایه جمع آوری و در این بانک نگهداری می شود.

Thanks for your attention