شناسایی کلستریدیوم بوتولینوم تیپ A، B و E با استفاده از مultiplex PCR

مجتبی سعادتی، M.Sc.7. شهرام نظریان، M.Sc.8. جعفر امانی، M.Sc.9. و هادی شیرزاد، M.D.10.

آدرس مکاتبه: دانشگاه امام حسین (ع) - دانشکده علوم پایه - گروه علوم ریسی - تهران - ایران

تاریخ انتشار مقاله اصلشده: 1384/10/30
تاریخ دریافت مقاله قبلی مقاله: 1384/8/19

خلاصه

مقدمه: باکتری کلستریدیوم بوتولینوم قادر به تولید اسپور بوده و می‌تواند با تولید سم کشته باعث بیماری فلج شل و/or بوتولینوم شود. تشخیص بوتولینوم با ایجاد سم و/or با کاتری در نمونه غنی مشکوک امکان‌پذیر است. روش استاندارد برای بافت اقامت سم استفاده از حیوان آزمایشگاهی می‌باشد. ابن روش سبب سایی حساس و اختصاصی ویل بر هرجه، زمان بر و بر حسب بوده، نیاز به استفاده از حیوان آزمایشگاهی دارد و تعداد محدودی از نمونه‌ها را می‌توان در یک زمان مورد بررسی قرار داد. روش‌های دیگری از جمله استفاده از انتی‌بادیها در مسائل تشخیصی و آزمایشی تولیدی، تراکمی، و/or افزایش در این تحقیق برای شناسایی تیپ‌های A، B و E کلستریدیوم بوتولینوم که در انسان اجباری بیماری می‌کند، از روش استفاده شد.

مواد و روش کار: تأیید اولیه تیپ‌های باکتری کلستریدیوم بوتولینوم مورد استفاده در این تحقیق با روش Bioassayی و تیز PCR صورت گرفت. چگر شناسایی بوش استاندارد PCR شد. جفت پراپیرا با دمای ذوب تنظید به E و A هم طراحی گردید، هر پراپیرا به طور اختصاصی برای یک سم بوتولینوم تیپ‌های A و E عامل نموده و این سه جفت پراپیرا قادرون بوده طور همزمان سه سروتیب را شناسایی نماید.

نتایج: بزرگ‌مقیاس PCR تیپ‌های A، B و E به ترتیب 78.5 ،205 و 389 جفت بار که با روش هضم آنزیمی PCR تایید شد، با کاتری کلستریدیوم پرفزنگی به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت و نتایج PCR آن با پراپیراهای طراحی شده منفی بود.

پژوهش: این روش سریع، حساس و دقیق بوده و از آن در جهت شناسایی سه تیپ بیماری‌ای انسانی باکتری کلستریدیوم پرفزنگی می‌توان استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: شناسایی، کلستریدیوم بوتولینوم، Multiplex PCR assay.
مقدمه
کلتیریدیوم بوتولینوم (Clostridium botulinum) سمومیت غذایی به نام بوتولینوم (botulism) می‌باشد که در سراسر جهان در اکثر کشورها و بخصوص ایران مشاهده می‌شود. بوتولینوم به دو گروه کلتیریدیوم بوتولینوم با توقف شیمیایی اکراسیمی می‌باشد: 

1) بوتولینوم با توقف شیمیایی اکراسیمی

این گروه شامل انواع بوتولینوم A، B، C، D، E و F است. 

2) بوتولینوم با توقف شیمیایی اکراسیمی

این گروه شامل انواع بوتولینوم A، B، C، D، E و F است. 

برای تشخیص بوتولینوم از منابع مختلف ممکن است از روش‌های مختلف قرار گیرد. 

در این مطالعه به ترتیب در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران، 

در آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه علوم پزشکی تهران.
مواد و روش کار

مواد: آنزیمی Taq DNA polymerase، سوپر ۱۰۰ bp DNA ladder، MgCl۲، dNTP، EDTA، Tris-base، RNase، KCl و ۲۰۰ میکروایت برای از بین بردن نه‌ای DNA. شاخ صورتی بیماری گرفته شده از B.۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در تی‌بی‌ای (B) در سه روز از آغاز بیماری در بیماری‌های انسانی بود (جدول ۱) استفاده شد. آزمون‌های بوشیمپین و ازون خزی سایر مورد تأیید قرار گرفتند [۱۸، ۲۰].

توپینه DNA: تپینه DNA از نگه‌داشتن بیک در در محفظه PCR

جدول ۱: واکنش PCR

تعداد سیکل‌ها | زمان | درجه حرارت | محلول
---|---|---|---
۱ | ۵ دقیقه | دانه‌وره کردن اولیه | ۱
۲۵ | ۱ دقیقه | دانه‌وره کردن اولیه | ۲
۳ | ۳ دقیقه | دانه‌وره کردن اولیه | ۲
۳ | ۱ دقیقه | کنار آدنی | ۲
۲ | ۱ دقیقه | کنار آدنی | ۲
۳ | ۲ دقیقه | کنار آدنی | ۳

برای شناسایی کلستریدیوم بوتولینوم تیب، B و E با استفاده از PCR، از ۲۰۰ میکروایت باعث موجب شد. از تی‌بی‌ای تیب E را در حالت بیماری مورد استفاده می‌کرد. در حالت بیماری مورد از تی‌بی‌ای، تیب E و B در حالت بیماری مورد استفاده می‌کرد. در حالت بیماری مورد استفاده می‌کرد. در حالت بیماری مورد استفاده می‌کرد. در حالت بیماری مورد استفاده می‌کرد. در حالت بیماری مورد استفاده می‌کرد. در حالت بیماری مورد استفاده می‌کرد.
هضم آنزیمی محصول با کلسترئیدوم بیوتولینوم می‌یافته که تأثیر محصول را به بررسی زن هدف، آنزیم‌های محدودگر مناسب برای هر محصول به‌عنوان و محصولات با آنزیم‌های مورد نظر بر اساس شدن. بررسی حساسیت واکنش PCR جهت بررسی میزان حساسیت واکنش PCR، شامل بر تیپ‌های مختلف مستقیم از سوسپانسیون گو روگ‌های مختلف تیپه و واکنش انیم گرفته.

تمین ویژگی واکنش PCR به منظور بررسی واکنش متقاطع بین سوه‌های مختلف کلسترئیدوم، با استفاده از کلسترئیدوم بفرنژنس و نیز با استفاده از پراپرها احتمالی کلسترئیدوم بیوتولینوم، واکنش PCR انیم. شد این واکنش بین تیپ‌های مختلف بیوتولینوم مورد بررسی قرار گرفت. جهت اطمینان از حساسیت ویژگی واکنش PCR در فاصله زمانی معین و همچنین در طول یک روز و با تغییر مواد اثر فکر از آزمایشات، کنین بر این واکنش و Mono PCR بیومرکین واکنش PCR E و B، A، و تناژ مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج
پس از کشتن باکتری سوسپانسیون حاوی تعداد مشخص تحت روی لیز قلبی برای یافته‌ای از کروموزومی PCR قرار گرفت و سپس کیفیت استخراج شده بر روی زل آگاروز یک درصد DNA بررسی شد. همان طور که در شکل 1 دیده می‌شود استخراج شده خاری RNA بوده و از کیفیت مناسبی جهت انیم PCR برخوردار است. ستون 1 مربوط به استخراج شده از باکتری کلسترئیدوم بیوتولینوم و B، A، E و می‌باشد. ستون 2 و 3 کروموزومی E و B که از سوسپانسیون کشید باکتری DNA تحلیل نموده شده است.

پس از سنتز پراپرها، خلوص آنها بر روی زل یلی آکریل آمید 10 درصد بررسی و عدم آبگی احتمال تأیید شد برای انیم واکنش PCR هر سوی به طور باکتریهای احتمالی چون در WA و واکنش PCR قرار داده شد (شکل 3) در واکنش PCR با杜绝 قطعات 283، 285 و 287 برای هر تیپ قطعات 283 و 285 و 287. در ترتیب
به منظور تأیید قطعات به دست آمده از واکنش PCR البرسی محصولات دو روش زل اگاروز، محصولات تیپ E و T1/100 تنها و به‌طور گروه PCR واکنش با رنگ قرمز مختلف از غلظت 100 نانومولتر در یک میکروتیتر از DNA الگوی نمونه و یک صدای نانومولتر از الگو مرور شناسایی قرار گرفته و رنگ دهنده تیپ DNA با رنگ قرمز PCR مشاهده می‌شود (شکل ۳).

شکل ۳: نمونه جهت PCR با انتزاع‌های محصولات BclI (زد اگاروز) درصد

برای تایید PCR میزان حساسیت بکتتریدوم بروتونیلوم به

برای تایید PCR میزان حساسیت بکتتریدوم بروتونیلوم به

به منظور شناسایی هر سه تیپ E و B, A PCR کلتستریدوم بروتونیلوم به

به منظور شناسایی هر سه تیپ E و B, A PCR کلتستریدوم بروتونیلوم به

به منظور تایید محصولات میزان حساسیت و یک‌گانه واکنش

پس از تایید محصولات میزان حساسیت و یک‌گانه واکنش

برای تایید مختلف بررسی شد. زنده‌ریز هر تیپ با برای‌برایهای اختصاصی تیپ های دیگر در واکنش PCR مورد استفاده قرار

گرفت. همچنین از زنده و سالون باکتری کلتستریدوم بروتونیلوم نيز

در واکنش PCR با برای‌برایهای اختصاصی کلتستریدوم بروتونیلوم

استفاده شد که تمام واکنش‌ها متنی پودنده و اختصاصی بودند

تست مورد استفاده مشخص گردید.

شکل ۲: توزیع محصولات PCR با انتزاع‌های محصولات BclI (زد اگاروز) درصد

برای تایید PCR میزان حساسیت بکتتریدوم بروتونیلوم به

برای تایید PCR میزان حساسیت بکتتریدوم بروتونیلوم به

به منظور شناسایی هر سه تیپ E و B, A PCR کلتستریدوم بروتونیلوم به

به منظور شناسایی هر سه تیپ E و B, A PCR کلتستریدوم بروتونیلوم به

به منظور تایید محصولات میزان حساسیت و یک‌گانه واکنش

پس از تایید محصولات میزان حساسیت و یک‌گانه واکنش

برای تایید مختلف بررسی شد. زنده‌ریز هر تیپ با برای‌برایهای اختصاصی تیپ های دیگر در واکنش PCR مورد استفاده قرار

گرفت. همچنین از زنده و سالون باکتری کلتستریدوم بروتونیلوم نيز

در واکنش PCR با برای‌برایهای اختصاصی کلتستریدوم بروتونیلوم

استفاده شد که تمام واکنش‌ها متنی پودنده و اختصاصی بودند

تست مورد استفاده مشخص گردید.

شکل ۲: توزیع محصولات PCR با انتزاع‌های محصولات BclI (زد اگاروز) درصد

برای تایید PCR میزان حساسیت بکتتریدوم بروتونیلوم به

برای تایید PCR میزان حساسیت بکتتریدوم بروتونیلوم به

به منظور شناسایی هر سه تیپ E و B, A PCR کلتستریدوم بروتونیلوم به

به منظور شناسایی هر سه تیپ E و B, A PCR کلتستریدوم بروتونیلوم به

به منظور تایید محصولات میزان حساسیت و یک‌گانه واکنش

پس از تایید محصولات میزان حساسیت و یک‌گانه واکنش

برای تایید مختلف بررسی شد. زنده‌ریز هر تیپ با برای‌برایهای اختصاصی تیپ های دیگر در واکنش PCR مورد استفاده قرار

گرفت. همچنین از زنده و سالون باکتری کلتستریدوم بروتونیلوم نيز

در واکنش PCR با برای‌برایهای اختصاصی کلتستریدوم بروتونیلوم

استفاده شد که تمام واکنش‌ها متنی پودنده و اختصاصی بودن

تست مورد استفاده مشخص گردید.

شکل ۲: توزیع محصولات PCR با انتزاع‌های محصولات BclI (زد اگاروز) درصد

برای تایید PCR میزان حساسیت بکتتریدوم بروتونیلوم به
بررسی قرار گرفتن است (ستون 3 و 4). جهت تسهیل در شناسایی نیز و اکتشش برای هر سی سپار باکتری انجام شد که در ستون 6 نشان داده شده است. به منظر بررسی حساسیت و ویژگی و اکتشش مکان، برای دریافت و اکتشش داده ها، اکتشش Multiplex PCR و تؤییج به دست آمده حاکی از تکرار تکراری و اکتشش های فوق بود

شکل 5: بررسی Multiplex PCR از تیپ‌های A، B و E کلستریدوم

بحث

کلستریدوم بیوتلیزوم عامل ایجاد کننده مسمومیت بیوتلیزوم در انسان و حیوانات می باشد. با توجه به وجود اسپور باکتری در مناطق مختلف و احتمال آمودگی مواد غذایی و محیط باکتری و احتمال استفاده از آن در حالات بیولوژیکی و بیوتروپی، شناسایی عامل ایجاد مسمومیت از آن به خصوص هنگام بروز بیماری است.

کلستریدوم بیوتلیزوم از روش‌های مهم در تشخیص کلستریدوم بیوتلیزوم در نمونه‌های غذایی، کلنیکی و محیطی می‌باشد. در چند این روش که یک روش استاندارد است، اما خالی از اشکال نیز و دارای مزایای زیادی می‌باشد. بکی از این مسابقات طولانی بودن زمان تست سنجش بیولوژیک بوده، به طوری که 24 ساعت زمان
شناسایی کلستریدیوم بوتو لوینوم تیب A و E با استفاده از Multiplex PCR

در این تحقیق به منظور شناسایی هر سه تیب A, B, و E کلستریدیوم بوتو لوینوم بهطور مجزا و نیز همزمان، از اکشش Multiplex PCR بهطور جدایی، برای هر سه استفاده شد که قطعات B و E، A کلستریدیوم بوتو لوینوم بوده است. نتایج این تحقیق با گزارش لندرستو و همکارانش در سال 2001، مطابق بود که انتی‌بادی Multiplex PCR با بررسی‌های آن‌چه اتفاق افتاد در محدوده‌های مربوط به برش مخصوص PCR می‌تواند یک میانگین برای انتباش و مورد تأیید قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

بی‌ویژه ویلیامز، نیویورک، ایالات متحده آمریکا (ع) جناب آقای دکتر احمد فضالی، به جهت ارائه ارزیابی داده‌های افتخار و تشریح می‌گردد.

4- Park JB, Simpson LL. Inhalational poisoning by botulinum Toxin and inhalation vaccination with its heavy chain component. Infection Immunology 2003;71:1147-1154.
10- Saadati M, Salimyan J and Ebrahimif Production of chicken antibody (IgY) against botulinum neurotoxin type A for therapeutic usage. The 18th Congress of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine, Kyoto, Japan, 2002 October.p.0.25.

18- سالنی، سلیمانی، غفوری، ابراهیمی، رفیعی و امیری. تولید تریک به موش (آرامشگاهی) از خنثی فیوراز و آکشک زنجبیلی و پیوستگی در شرایط in vivo. ایلام. سالنی، سلیمانی، غفوری و امیری. تولید تریک به موش (آرامشگاهی) از خنثی فیوراز و آکشک زنجبیلی و پیوستگی در شرایط in vivo. ایلام. سالنی، سلیمانی، غفوری و امیری. تولید تریک به موش (آرامشگاهی) از خنثی فیوراز و آکشک زنجبیلی و پیوستگی در شرایط in vivo. ایلام. 

19- سالنی، سلیمانی، غفوری، ابراهیمی، رفیعی و امیری. تولید تریک به موش (آرامشگاهی) از خنثی فیوراز و آکشک زنجبیلی و پیوستگی در شرایط in vivo. ایلام. سالنی، سلیمانی، غفوری و امیری. تولید تریک به موش (آرامشگاهی) از خنثی فیوراز و آکشک زنجبیلی و پیوستگی در شرایط in vivo. ایلام. 

20- سالنی، سلیمانی، غفوری، ابراهیمی، رفیعی و امیری. تولید تریک به موش (آرامشگاهی) از خنثی فیوراز و آکشک زنجبیلی و پیوستگی در شرایط in vivo. ایلام. 