مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۷، شماره‌ی ۶۷، تابستان ۱۳۸۸، صفحات ۶۶ تا ۷۷

مقایسه‌ی دو روش مولکولی PCR و LAMP در تشخیص سالمونلا

ابوبکر مرادی[۱]، دکتر علی کرمی[۲]، دکتر علی حق‌نظری[۳]، زینب احمدی[۴]، دکتر رحیم سروری‌زنجانی[۵]، سیده مهری جوادی[۶]

نویسنده‌ی مسؤل: تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج)، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی Karami@bmsu.ac.ir

دریافت: ۸۷/۲/۱۶ پذیرش: ۸۸/۲/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: *روش‌های مختلفی جهت تشخیص سالمونلا وجود دارد. اما روش‌هایی که بر پایه‌ی ژنوم و DNA هستند، تکنیک‌های بهتری جهت تشخیص می‌باشند. PCR روشی سریع و حساس است و به علت کارایی بالا به طور گسترده‌ای در تشخیص سریع پاتوژن‌ها به کار گرفته می‌شود. اما دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد (استفاده از دستگاه‌های مربوطه زمان و هزینه زیادی را می‌طلبد)، به همین دلیل جهت رفع این مشکلات روشی به کار گرفته شد که معایب روش‌های مبتنی بر PCR را به حداقل برساند.*

روش بررسی: *در این بررسی از روش تکثیر هم دمای وابسته به حلقه (LAMP) استفاده شد و با PCR مورد مقایسه قرار گرفت. برای مقایسه‌ی PCR و LAMP از ۷ سویه‌ی مختلف سالمونلا استفاده شد. برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر استفاده شد اما در روش LAMP بدون نیاز به دستگاه گران قیمت ترموسایکلر و تنها با استفاده از یک بلوک دمایی ساده و ارزان، ساخت داخل کشور تشخیص انجام شد.*

یافته‌ها: *نتایج نشان داد که هر دو روش LAMP و PCR به طور اختصاصی قادر به شناسائی سالمونلا می‌باشند. روش LAMP بر خلاف PCR که بر روی ژل الکتروفورز الگوی تک باند ایجاد می‌نماید یک الگوی نردبانی ایجاد می‌نماید و در کنترل منفی هیچ باندی مشاهد نمی‌شود. همچنین روش LAMP ۱۰۰ برابر حساس‌تر از PCR معمولی است. بر اساس نتایج این تحقیق در روش LAMP در عرض کمتر از ۹۰ دقیقه تشخیص انجام شد ولی در PCR معمولی تشخیص بیش از ۳ ساعت به طول انجامید. مزیت دیگر این روش عدم وابستگی به چرخه‌های دمایی و دستگاه ترموسایکلر بود.*

نتیجه‌گیری: *روش LAMP در مقایسه با PCR تقریباً ۳ برابر سریع‌تر، ۱۰۰ برابر دقیق‌تر، ۱۰ برابر ارزان‌تر است که می‌تواند کاربرد گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی، پزشکی قانونی، کشاورزی، تحقیقاتی و آزمایشگاه‌های کوچک و سیار داشته باشد و جهت مطالعات همه گیرشناسی، تشخیص و شناسایی مورد استفاده قرار گیرد.*

واژگان کلیدی: سالمونلا، ایزوترمال، PCR، DNA، LAMP

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه زنجان، عضو گروه بیوتکنولوژی جهاد دانشگاهی زنجان

۲- دکترای تخصصی بیولوژی مولکولی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)

۳- دکترای تخصصی بیوتکنولوژی، دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

۴- کارشناس ارشد سلولی ومولکولی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)

۵- دکترای تخصصی میکروب شناسی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج) و دانشگاه علوم پزشکی زنجان

۶- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه زنجان، عضو گروه بیوتکنولوژی جهاد دانشگاهی زنجان

مقدمه

سالمونلاها دسته‌ی بزرگی از باسیل‌های گرم منفی می‌باشند که از نظر مورفولوژی شبیه سایر باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه هستند. اکثر گونه‌ها متحرک و دارای تاژک پریتریش هستند. این باکتری‌ها بی‌هوازی اختیاری می‌باشند و در طیف وسیعی از دما (۷ تا ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) و pH ۴ تا ۸ قادر به رشد می‌باشند. اما بهترین دما جهت رشد، ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH ۷ می‌باشد. این باکتری‌ها مقاوم به سرما و خشکی بوده، قادر به رشد در دمای کمتر از ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و تحمل pH پایین‌تر از ۴ نیز می‌باشند. سالمونلاها به حرارت حساس بوده، در دمای ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و بالاتر از بین می‌روند (۳-۱).

سالمونلاها عمدتاً از راه دهان وارد بدن شده، در روده جایی که بیماری‌زایی خود را شروع می‌کنند، جایگزین می‌شوند. بیماری حاصل از سالمونلا دارای سه حالت اصلی است که شامل تب روده‌ای (تیفوئید)، باکتریمی و آنتروکولیت است و هر یک باعث بروز عوارض متعددی می‌شود که می‌توان به تب، سردرد، کندی ضربان قلب، استفراغ، اسهال، ازدیاد حجم کبد و طحال، تورم کیسه صفرا، زخم و ضایعات مفصلی اشاره نمود. به گزارش سازمان جهانی بهداشت ۱۶ تا ۳۳ میلیون مورد بیمار و ۵۰۰ تا ۶۰۰ هزار مرگ سالیانه یک معضل بزرگ بهداشتی در جهان به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما می‌باشد (۴). از این رو تشخیص به موقع و درست این باکتری در مواد غذایی و افراد مشکوک به آلودگی ضروری به نظر می‌رسد. روش‌های تشخیصی متعددی جهت شناسائی این باکتری وجود دارد که به هر یک اشاره می‌شود. تشخیص توسط کشت، که شامل کشت در محیط‌های غیرانتخابی غنی‌شده و در ادامه کشت در محیط‌های انتخابی است و سپس کلونی‌های مشکوک از نظر بیوشیمیایی مورد تأیید قرار می‌گیرند، تکمیل این تست نیاز به سه تا چهار روز زمان برای حصول نتیجه‌ی منفی و به بیش از هفت روز برای تأیید نتیجه‌ی مثبت نیاز دارد (۵). از دیگر روش‌ها می‌توان به روش‌های سرولوژیک، تکنیک‌های الکتریکی و آنالیز نشانگرهای اسیدهای نوکلئیک اشاره نمود، اما هنوز مشکلات بسیاری در رابطه با حساسیت و اختصاصیت این روش‌ها وجود دارد و زمان آنالیز بسته به حساسیت سیستم تشخیصی از چند ساعت تا چندین روز متفاوت است و به علت مشکلات تکنیکی، سختی کار و زمان زیاد جهت تشخیص این روش‌ها عمومیت چندانی نیافته‌اند (۶). روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR که در دهه‌های اخیر بسیار مورد توجه دانشمندان علوم زیستی قرار گرفته است، روشی سریع و حساس می‌باشد که قادر است تعداد نسخه‌ی اندکی از DNA هدف را تا سطحی که توسط ژل الکتروفورز قابل تشخیص باشد تکثیر نماید، به علت کارایی بالا و قدرت زیاد PCR این روش در سال‌های اخیر به طور گسترده‌ای در تشخیص سالمونلا به کار گرفته شده است، گرچه این روش دارای مزایای بسیاری است اما دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد که می‌توان به موارد نمود: استفاده از چرخه‌های حرارتی جهت تکثیر (۳۰ تا ۴۰ چرخه)، استفاده از دستگاه ترموسایکلر که گران است روش‌های آشکارسازی و تشخیص محصول PCR که عمدتاً با مشکلاتی نظیر استفاده از مواد سمی و خطرناک مثل بروميداتيديدم همراه است، اشاره نمود. این محدودیت‌ها موجب گردیده تا این روش تنها در آزمایشگاه‌های مجهز که دارای افراد متخصص است به کار گرفته شود و در مکان‌هایی که امکان به کارگیری وسایل مجهز آزمایشگاهی وجود ندارد و همچنین در مناطق دور افتاده و محروم که نیاز به تشخیص عوامل میکروبی از جمله سالمونلا جهت جلوگیری از خسارات شدید است نتوان از این روش استفاده نمود (۸-۶). بنابراین نیاز به روشی ساده‌تر با کارایی بالاتر است که علاوه بر انجام آن در آزمایشگاه‌های مجهز بتوان آن را در آزمایشگاه‌های عادی و کوچک حتی توسط افراد غیر متخصص نیز انجام داد. روش

جدیدی به نام تکثیر هم دمای DNA وابسته به حلقه و [Loop- Mediated Isothermal Amplification of DNA (LAMP)] توسط نوتومی و همکاران در سال ۲۰۰۰ معرفی گردید که واجد این مشخصات است. در این روش DNA با اختصاصیت، کارایی و سرعت بالا در یک دما تکثیر می‌شود. در این روش از ۴ پرایمر (دو پرایمر داخلی و دو پرایمر خارجی) استفاده می‌شود، که در مجموع ۶ ناحیه‌ی ژنی از DNA هدف را مورد شناسایی قرار می‌دهد و طی فرآیندی دنباله‌دار و با تشکیل نواحی سنجاق سری در دمای ۶۰تا۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و استفاده از یک آنزیم DNA پلیمراز مقاوم به حرارت تکثیر می‌یابد (۹). در روش LAMP کل واکنش تکثیر تحت شرایط تک دمایی به شکل پیوسته انجام می‌پذیرد. روش LAMP نیاز به مرحله‌ی واسرشت‌سازی (Denaturation) اسید نوکلئیک دو رشته‌ای به تک رشته‌ای برای شروع واکنش پلیمریزاسیون ندارد. حتی بدون واسرشت‌سازی اولیه واکنش به راحتی انجام می‌پذیرد. کارایی تکثیر در این روش، فوق‌العاده بالاست. زیرا در اینجا هیچ زمانی جهت تغییر دما از دست نمی‌رود و واکنش در دمای بهینه‌ی فعالیت آنزیم به شکل پیوسته انجام می‌گیرد و ۱۰تا ۲۰ میلی‌گرم از DNA هدف در ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش در عرض ۳۰ تا ۶۰ دقیقه تکثیر می‌یابد. روش LAMP قادر است که ژن هدف را با کارایی بسیار بالا به‌وسیله‌ی طراحی ۴ پرایمر که ۶ ناحیه‌ی توالی هدف را شناسایی می‌نمایند، تکثیر نماید. هزینه‌ی کلی با این روش، بسیار کاهش می‌یابد، زیرا روش LAMP نیاز به مواد شیمیایی ویژه یا دستگاه‌های گران قیمت آزمایشگاهی ندارد. محصولات تکثیر شده دارای ساختار مرکبی از توالی‌های متناوب (Alternately) معکوس (Inverted) تکراری (Repeats) از توالی (Sequence) هدف (Target) روی همان رشته می‌باشند (۱۳-۱۰). پر واضح است که LAMP نیز همانند سایر روش‌ها دارای محدودیت‌هایی است که به آنها اشاره می‌شود.

پیچیدگی طراحی پرایمرهای چندگانه برای تکثیر هر ناحیه‌ی ژنی جدید و انتخاب نواحی مناسب در توالی ژنی مورد نظر جهت طراحی مناسب و کارآمد پرایمرها، ایجاد محصول پیچیده حاصل از تکثیر DNA که ساختارهایی مثل گل کلم در اندازه‌های مختلف را ایجاد می‌نماید، که راه را برای استفاده از روش‌های مبتنی بر هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک مانند Microarray با مشکل مواجه می‌نماید (۱۴)، از محدودیت‌های آن است. با توجه به محدودیت‌های فوق‌الذکر باید هنگام استفاده از این روش به این موارد توجه نمود تا نتیجه‌ی مطلوب حاصل گردد. مزایای LAMP باعث گردیده که به عنوان روشی سریع و دقیق در تشخیص پاتوژن‌ها از جمله سالمونلا به کار رود و به ایجاد روش‌های تشخیصی سیار و سریع در مناطقی که امکان استفاده از آزمایشگاه‌های روتین وجود ندارد منجر گردد. در این مطالعه هر دو روش PCR و LAMP برای تشخیص سالمونلا به کار گرفته شد و نشان داده شد که روش LAMP نسبت به PCR آسان‌تر، سریع‌تر و دقیق‌تر است.

روش بررسی

در این تحقیق از ۷ سویه‌ی مختلف سالمونلا (سالمونلا تیفی، سالمونلا پاراتیفی A، سالمونلا پاراتیفی B، سالمونلا پاراتیفی C، سالمونلا اینتریتیدیس، سالمونلا اینفنتیس، سالمونلا هاوانا) استفاده شد. جهت استاندارد نمودن آزمایش، سویه‌های استاندارد سالمونلا و سایر انتروباکتری‌ها از آزمایشگاه رفرانس وزارت بهداشت تهیه شدند. نمونه‌ها به شکل لیوفیلیزه در لوله‌های مخصوص دریافت گردیدند. مواد شیمیایی از شرکت مرک، بافر cl_2Mg، نوکلئوتیدها و آنزیم *Taq* از شرکت‌های داخلی (سینا ژن) و آنزیم *Bst* پلیمراز نیز از شرکت بیولب [BioLab(New England)] تهیه گردید. در PCR از دستگاه مسترسایکلر (Mastercycler gradient ساخت شرکت اپندروف آلمان)، جهت چرخه‌های حرارتی

استفاد شد و از یک بلوک حرارتی ساخت شرکت کیا ژن، جهت انجام واکنش LAMP استفاده شد. از دستگاه الکتروفورز افقی کوچک (ساخت شرکت پایا پژوهش مشهد) و منبع تغذیه آن با بافر ۱٪ TBE جهت الکتروفورز استفاده شد. جهت بررسی ژل از دستگاه یووی‌داک (UVIdoc ساخت شرکت UVIec انگلیس) استفاده شد و از مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت باز شرکت فرمنتاز شامل ۱۱ باند ۸۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ (باند ضخیم‌تر) ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰ و ۱۰۳۰ جفت باز استفاده شد.

کشت و استخراج DNA: از نمونه‌های تهیه شده به میزان ۵۰ میکرولیتر در ۱/۵ سی‌سی محیط کشت مایع LB کشت داده شد و به مدت ۱۸تا۲۴ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از گذشت این زمان تمام نمونه‌ها رشد کردند و DNA سالمونلاهای کشت داده شده به روش استاندارد فنل کلروفرم (۱۶و ۱۵) استخراج شد.

آغازگرهای PCR: در انجام تست PCR از آغازگرهایی (پرایمر) استفاده شد که توسط کرمی و همکاران (۱۸و۱۷) جهت تشخیص مولکولی سالمونلا طراحی شده بودند. توالی پرایمرها در جدول ۱ ذکر شده است. پرایمرهای دریافتی بر اساس غلظت ذکر شده توسط شرکت سازنده‌ی پرایمر، در آب مقطر تزریقی با غلظت ۱۰۰ پیکو مول تهیه شدند و سپس با رقت ۲۰ پیکومول تهیه و جهت استفاده در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد زیر صفر نگهداری شدند.

پرایمرهای LAMP: در انجام تست LAMP از پرایمرهایی استفاده شد که توسط میدا و همکاران و نیز هراکودو و همکاران (۱۹و۱۸) جهت تشخیص مولکولی سالمونلا طراحی شده بودند (شکل ۱)(۲۰). توالی پرایمرها در جدول ۲ نشان داده شده است. پرایمرهای دریافتی بر اساس غلظت ذکر شده توسط شرکت سازنده‌ی پرایمر، در آب مقطر تزریقی با غلظت ۱۰۰ پیکومول تهیه شده، سپس با رقت ۲۰ پیکومول تهیه و جهت استفاده در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد زیر صفر نگهداری شدند.

انجام PCR بر روی نمونه‌های استاندارد: واکنش PCR جهت تکثیر ژنوم سالمونلا در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۱۴ میکرولیتر آب مقطر تزریقی، ۲/۵ میکرولیتر بافر X ۱۰، ۳ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲/۵ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز، $Mgcl_2$(25 mM) با غلظت نهایی ۲ میلی‌مولار، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP mix (100 mM each) و سپس ۱ میکرولیتر از نمونه‌های ژنومی استخراج شده به لوله‌های حاوی ترکیبات فوق اضافه شد و در دستگاه مسترسایکلر (Master cycler) اپندروف که دارای ویژگی بررسی گرادیان دمایی است قرار گرفت و طبق برنامه‌ی زیر PCR انجام شد. مرحله‌ی اول ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس ۳۰ چرخه شامل سه مرحله ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه و مرحله‌ی نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه قرار گرفت. برای سهولت کار در تمام آزمایشات Master mix تهیه شد. پس از خاتمه‌ی برنامه، مقدار ۳ تا ۵ میکرولیتر از محصول با ۱ تا ۲ میکرولیتر از بافر مخصوص نمونه‌گذاری مخلوط شده و در ژل آگارز ۱٪ قرار داده شد. پس از قرار دادن مارکر مولکولی، الکتروفورز در ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. پس از خاتمه الکتروفورز، ژل در محلول حاوی برومیداتیدیوم (۰/۵ تا ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی و پس از شست‌وشو در بافر، بر روی دستگاه ماوراء بنفش بررسی و عکس‌برداری شد.

انجام LAMP بر روی نمونه‌های استاندارد: واکنش LAMP جهت تکثیر ژنوم سالمونلا در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۱۱/۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی، ۲/۵ میکرولیتر بافر X ۱۰، ۲ میکرولیتر از پرایمرهای داخلی (FIP,BIP)، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای خارجی (F3,B3)، ۸ واحد آنزیم *Bst* پلیمراز، Betaine با غلظت نهایی

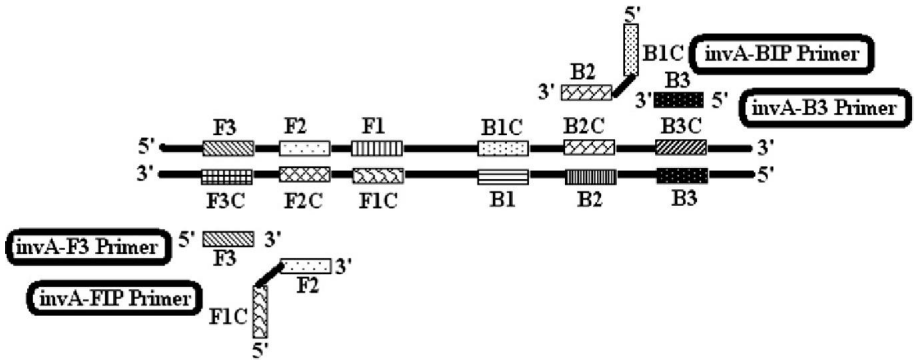
۰/۴ میلی‌مول، ۰/۲ میلی‌مول dNTP mix و سپس ۳ میکرولیتر از نمونه‌های ژنومی استخراج شده به لوله‌های حاوی ترکیبات فوق اضافه شد و در دستگاه ترموبلاک (Thermo Block) قرار گرفت و طبق برنامه‌ی زیر واکنش LAMP انجام شد، مرحله‌ی اول ۶۰ دقیقه در ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در مرحله‌ی دوم ۱۰ دقیقه در ۸۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خاتمه‌ی برنامه مقدار ۳ تا ۵ میکرولیتر از محصول با ۱ تا ۲ میکرولیتر از بافر مخصوص نمونه‌گذاری مخلوط شده و در ژل آگارز ۲٪ قرار داده شد. پس از قرار دادن مارکر مولکولی، الکتروفورز در ولتاژ ۸۵ به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. پس از خاتمه الکتروفورز، ژل در محلول حاوی بروماید اتیدیوم (۰/۵ تا ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی و پس از شست‌وشو در بافر، بر روی دستگاه ماوراء بنفش بررسی و عکس‌برداری شد.

جدول ۱: توالی آغازگرهای استفاده شده برای واکنش PCR

ردیف	نام آغازگر	توالی	اندازه (bp)	اندازه‌ی محصول تولیده شده(bp) در PCR
۱	S۳	5'-CTTGCTATGGAAGACATAACGAACC -3'	۲۵	۲۵۸
۲	S۴	5'-CGTCTCCCATCAAAAGCTCCATAGA -3'	۲۴	
۳	S۱۲	5'- GTATTGTTGATTAATGAGATCCG-3'	۲۳	۳۷۳
۴	S۱۳	5'- ATATTACGCACGGAAACACGTT-3'	۲۲	

*جدول ۲: توالی آغازگرهای استفاده شده برای واکنش **LAMP***

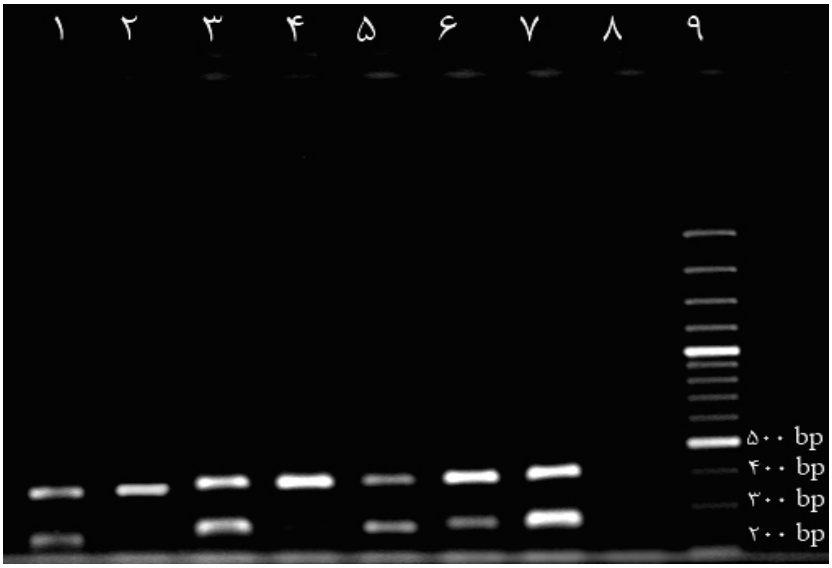
ردیف	نام آغازگر	نوع	طول	توالی
۱	FIP	Forward-inner (5^0-F1C-TTTT-F2–3^0)	46nt(F1C, 22nt; F2, 20nt)	5'-GACGGCTGGTACTGATCGATAGTTTTTCAACGTTTCCTGCGG -3'
۲	BIP	Backward-inner (5^0-B1C-AAAA-B2–3^0)	45nt(B1C, 21nt; B2, 20nt)	5'-CCGGTGAAATTATCGCCACACAAAACCCACCGCCAGG -3'
۳	F3	Forward outer	22nt	5'-GGCGATATTGGTGTTTATGGGG -3'
۴	B3	Backward outer	20nt	5'-AACGATAAACTGGACCACGG -3'



شکل ۱: پرایمرهای طراحی شده از ژن invA برای انجام واکنش LAMP

یافته‌ها

چنانکه در شکل ۲ دیده می‌شود نتیجه‌ی بررسی نمونه‌ها با دو جفت پرایمر و انجام PCR معمولی، دو باند به اندازه‌های ۳۷۳ و ۲۵۸ جفت باز مشاهده گردید، سالمونلا اینفنتیس و سالمونلا هاوانا با پرایمرهای S۱۲-S۱۳ که بر اساس ژن *invA* طراحی شده مانند دیگر سویه‌ها باند ۳۷۳ را ایجاد کردند، اما با پرایمرهای S۳-S۴ هیچ باندی تولید نکردند. در حالی که این پرایمرها در دیگر سویه‌ها باند ۲۵۸ جفت باز را تولید نمودند (شکل ۲).



۳۷۳ bp →

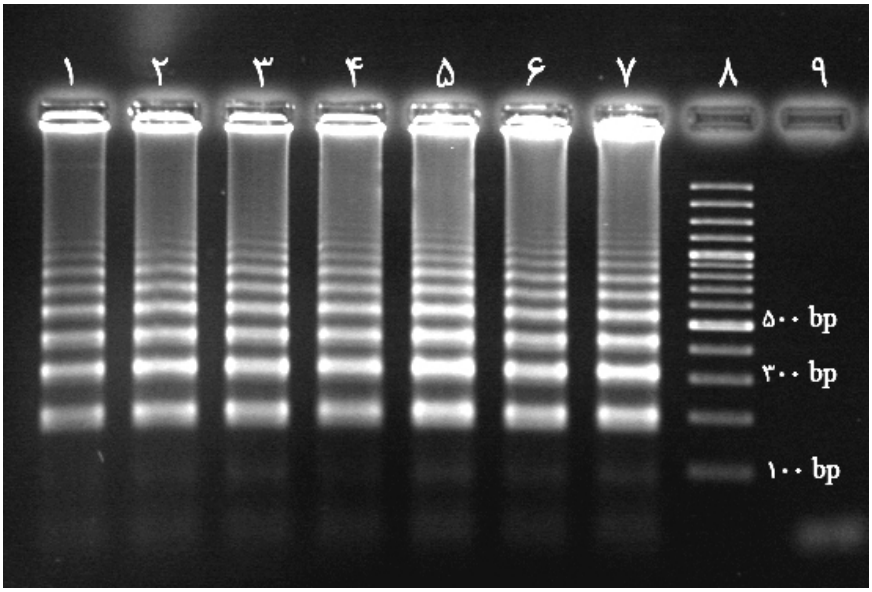
۲۵۸ bp →

شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR برای ژن invA با استفاده از پرایمرهای S12، S13 و S3، S4

۱- سالمونلا تیفی، ۲- سالمونلا اینفنتیس، ۳- سالمونلا اینتریتیدیس، ۴- سالمونلا هاوانا، ۵- سالمونلا پاراتیفی A، ۶- سالمونلا پاراتیفی B، ۷- سالمونلا پاراتیفی C، ۸- کنترل منفی (بدون DNA) و ۹- مارکر مولکولی

بعد از انجام PCR واکنش LAMP انجام شد. جهت بهینه نمودن شرایط واکنش LAMP از ژنوم سالمونلا تیفی استفاده شد. بعد از انجام بهینه سازی‌های لازم واکنش انجام شد و باندهای متعدد نردبانی شکلی با اندازه ۲۴۱bp به بالا مشاهده شدند، اما تا ۶۰۰bp نیز باندها قابل مشاهده بودند و باندهای بزرگ‌تر به علت غلظت بالای ژل قابل مشاهده نبودند. ایجاد این باندها دلالت بر انجام واکنش اختصاصی داشت. در کنترل منفی که فاقد DNA الگو بود هیچ باندی قابل رؤیت نبود. بعد از بهینه نمودن دمای واکنش بهترین نتیجه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بدست آمد زیرا در این دما میزان تکثیر DNA افزایش می‌یابد، برای مشخص کردن زمان واکنش LAMP زمان‌های مختلفی (۳۰، ۴۵ و ۶۰) به کار برده شد. در ۳۰ دقیقه، محصولی تولید نشد. در ۴۵ دقیقه، محصول اندکی تولید شد و در ۶۰ دقیقه، میزان محصولات به حداکثر رسید (جزئیات نشان داده نشده است). بنابراین واکنش

LAMP در ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه بهینه‌سازی شد و برای خاتمه‌ی واکنش نیز مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد.



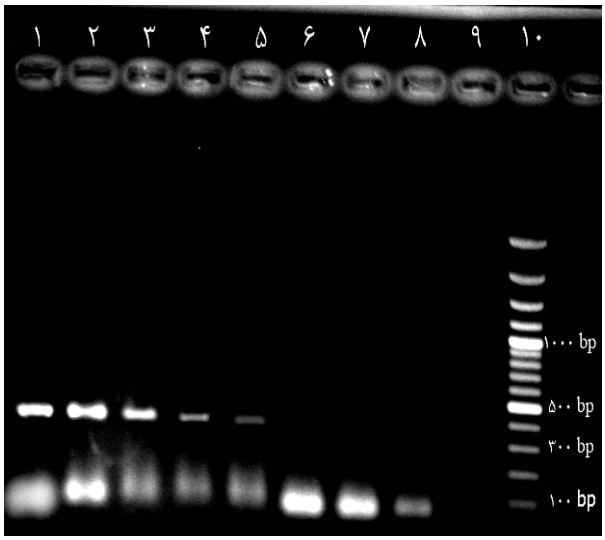
۲۴۱ bp →

شکل ۳: انجام واکنش LAMP با سویه‌های مختلف سالمونلا بعد از بهینه سازی شرایط واکنش.

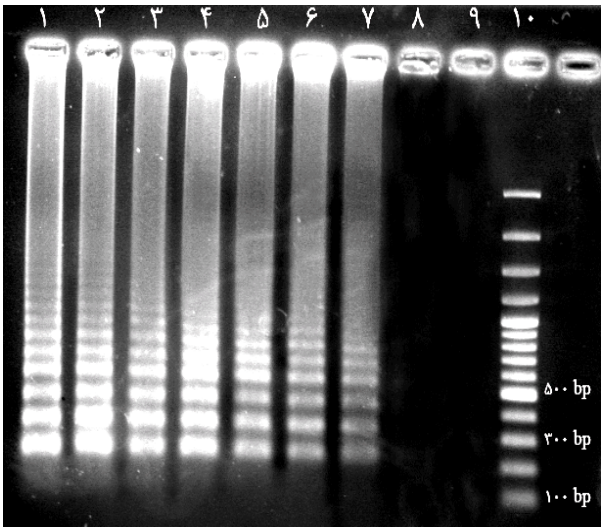
۱- سالمونلا تیفی، ۲- سالمونلا اینفنتیس، ۳- سالمونلا اینتریتیدیس، ۴- سالمونلا هاوانا، ۵- سالمونلا پاراتیفی A، ۶- سالمونلا پاراتیفی B، ۷- سالمونلا پاراتیفی C، ۸- کنترل منفی (بدون DNA) و ۹- مارکر مولکولی

مقایسه‌ی LAMP و PCR: در LAMP تنها ژن *invA* در اندازه‌های مختلف از ۲۴۱bp به بالا تکثیر می‌یابد ولی در PCR برای هر جفت پرایمر تنها یک باند مشاهده می‌گردد. برای پرایمرهای S۳ و S۴ باند ۲۵۸bp و پرایمرهای S۱۲ و S۱۳ باند ۳۷۳bp مشاهده می‌شود. در LAMP پرایمرهای طراحی شده تنها قادر به تکثیر ژن *invA* هستند و با این پرایمرها تنها سالمونلا از دیگر جنس‌های باکتریایی تشخیص داده می‌شود.

مقایسه‌ی حساسیت (Sensitivity) PCR با LAMP: برای تعیین حساسیت، رقت‌های مختلفی از ژنوم تهیه شد و با آن PCR و LAMP انجام شد. غلظت اولیه‌ی ژنوم ۲×۱۰^{۶} (کپی در میلی‌لیتر) بود. بنابراین از این ژنوم اولیه اقدام به رقیق‌سازی (Serial Dilution) از رقت $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۷}$ شد. با این روش می‌توان حساسیت PCR و LAMP را تعیین نمود. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، PCR تا رقت ۲×۱۰^{۲} (کپی در میلی‌لیتر) از ژنوم سالمونلا تیفی قادر به ایجاد باند بود و پس از آن در رقت‌های کمتر ژنوم هیچ باندی مشاهده نشد. ولی در LAMP تا رقت ۱۰-۲ (کپی در میلی‌لیتر) از ژنوم سالمونلا تیفی باند مشاهده می‌شود. بنابراین گزارش می‌شود که روش LAMP نسبت به PCR معمولی در تشخیص سالمونلا تا ۱۰۰ برابر حساس‌تر است (۲۲).



(الف)



(ب)

شکل ۴: مقایسه‌ی حساسیت (Sensitivity) PCR (شکل الف: در PCR باند اختصاصی ۳۷۳ bp مشاهده می‌شود) با LAMP (شکل ب: در LAMP با ژنوم اختصاصی سالمونلا الگوی نردبانی مشاهده می‌شود).

۱- کنترل مثبت (ژنوم سالمونلا تیفی)، ۲- رقت $۱۰^{-۱}$ از ژنوم سالمونلا تیفی، ۳- رقت $۱۰^{-۲}$ از ژنوم سالمونلا تیفی، ۴- رقت $۱۰^{-۳}$ از ژنوم سالمونلا تیفی، ۵- رقت $۱۰^{-۴}$ از ژنوم سالمونلا تیفی، ۶- رقت $۱۰^{-۵}$ از ژنوم سالمونلا تیفی، ۷- رقت $۱۰^{-۶}$ از ژنوم سالمونلا تیفی، ۸- رقت $۱۰^{-۷}$ از ژنوم سالمونلا تیفی، ۹- کنترل منفی (فاقد DNA ژنومی) و ۱۰- مارکر مولکولی.

بحث

روش‌های متداول تشخیص سالمونلا نیازمند زمان طولانی است که فاقد کارایی لازم جهت تشخیص سریع این باکتری می‌باشد (۱۵). از روش PCR معمولی جهت تشخیص، شناسایی و تفیکک سالمونلا از سایر انتروباکتریاسه‌ها استفاده شده است که این روش نیازمند دستگاه گران قیمت ترموسایکلر و چرخه‌های حرارتی و روش‌های پر زحمت آشکارسازی است (۱۱). بررسی روش‌های PCR فوق سریع موسوم به روش Real-time PCR در تشخیص سریع سالمونلا نشان داده است که می‌تواند کارایی مناسبی داشته باشد ولیکن دستگاه استفاده شده بسیار گران قیمت است (۲۱). بنابراین جهت مرتفع نمودن مشکلات روش PCR از روش جدید LAMP استفاده شد. LAMP روش تشخیصی سریع‌تر و مقرون به صرفه تری است. محققین جهت تشخیص ملکولی سالمونلا پرایمرهای مختلفی را بر اساس ردیف ژن‌های شناخته شده، *invA*، *invB*، *fiC-a*، *fiC-dT*، *tyv*، *prt*، *int-flom* و *spvC* طراحی و بررسی نموده‌اند (۲۶). در روش LAMP برای تشخیص سریع سالمونلا از دو جفت پرایمر طراحی شده بر اساس ژن *invA* که قادر به شناسایی انواع سالمونلا می‌باشد استفاده شد و تشخیص بسیار سریع و دقیق انجام گرفت (۲۰-۱۸).

این روش نسبت به دیگر روش‌های مولکولی دارای مزایای بسیاری است که به آنها اشاره می‌شود.

LAMP قادر است DNA را با کارایی بالا تحت شرایط شرایط تک دمایی (Isothermal) تکثیر نماید و تشخیص را می‌توان با تعداد اندک DNA شروع نمود، LAMP حتی قادر

است DNA را در کمتر از ۶ کپی در مخلوط واکنش شناسایی نماید. محصولات واکنش مخلوطی از DNA های ساختار سنجاق سر با اندازه‌های متفاوت و ساختارهای گل کلم مانند با حلقه‌های متعدد که از اتصال بین توالی‌های معکوس تکراری از توالی هدف را ایجاد می‌نمایند، که حتی در زیر میکروسکوپ نوری به راحتی قابل مشاهده‌اند، و امکان تشخیص انتخابی را فراهم می‌نمایند. LAMP بسیار اختصاصی عمل می‌کند زیرا با ۴ پرایمر قادر است که ۶ ناحیه‌ی ژنی از توالی هدف را در آغاز واکنش و ۴ ناحیه را در طی واکنش اصلی LAMP مورد شناسایی قرار دهد. روش LAMP ساده و انجام آن آسان است، و تنها نیاز به پرایمر، DNA پلیمراز و مخلوط واکنش دارد و نیازی به ترمو سایکلر ندارد و واکنش در حمام آب گرم یا بلوک‌های حرارتی قابل انجام است. به‌وسیله ترکیب با آنزیم نسخه برداری معکوس، LAMP قادر است توالی‌های RNA را با کارایی بالا تکثیر نماید (۹). امکان آشکار سازی نتیجه‌ی نهایی واکنش بر اساس کدر شدن محیط عمل واکنش که به واسطه‌ی آزاد شدن پیرو فسفات از dNTPها و ترکیب آن‌ها با یون‌های منیزیم در حین واکنش ایجاد می‌گردد و امکان آنالیز نتایج را آسان می‌نماید که این مورد در بین تمام روش‌های ملکولی تکثیر DNA بی نظیر است (۱۰). عدم نیاز به واسرشت نمودن DNA اولیه و حتی عدم نیاز به استخراج DNA اولیه از برخی نمونه‌های بیولوژیک (مانند محیط کشت مایع) می‌باشد (۲۴، ۲۳). امکان آشکارسازی محصول نهایی با استفاده از تکنیک هیبریداسیون با پروب‌های فلورسانس نیز وجود دارد (۲۵). مقایسه‌ی نتایج این تحقیق با تحقیقات مشابه نشان داد که استفاده از پرایمرهایی که بر اساس ژن *invA* طراحی شده‌اند، کارایی بالایی در تشخیص سالمونلا به روش LAMP دارند، زیرا این ژن از ژن‌های مهم مسئول تهاجم باکتری به سلول‌های اپیتلیال است. در این تحقیق با بهینه سازی‌های انجام شده در طی واکنش LAMP زمان نهایی تشخیص نسبت به PCR بسیار کوتاه گردید، جهت انجام این کار فاکتورهای مؤثر در واکنش از قبیل آنزیم، dNTP، پرایمرها، بتائین، DNA الگو و زمان انجام واکنش بهینه‌سازی شدند که نسبت به تلاش‌هایی که جهت کوتاه نمودن زمان تشخیص باکتری‌های بیماری‌زا از جمله سالمونلا که با دستگاه‌های متداول PCR صورت گرفته است، قابل توجه می‌باشد (۲۶). برای اولین بار هراکودو و همکاران اقدام به تشخیص سالمونلا به روش LAMP نمودند. زمان لازم برای تشخیص را بعد از انجام الکتروفورز، ۹۰ دقیقه گزارش نمودند. طبق یافته‌های این محققان حساسیت تست LAMP بسیار بالاتر از PCR بود. این مطالعه نشان داد که تست LAMP می‌تواند برای تشخیص سریع سالمونلا با حساسیت بالا بکار رود. بنابراین نتایج حاصل از این تحقیق برای حساسیت تست LAMP با نتایج این محققان انطباق دارد (۱۹). وانگ و همکاران اقدام به تشخص سالمونلا با روش LAMP در بقایای مواد غذایی نمودند، آنها زمان ۶۰ دقیقه را گزارش نمودند. حساسیت LAMP بر اساس این تحقیق ۱۰ برابر بیشتر از PCR اعلام شد. آنها نشان دادند که استفاده از ژن *invA* جهت طراحی پرایمر در تشخیص سالمونلا دارای اختصاصیت بالایی است و سویه‌های دیگر باکتریایی با استفاده از این آغازگرها قابل تشخیص نیستند. البته این آغازگرها قادر به تشخیص سویه‌های مختلف سالمونلا از یکدیگر نیستند. نتایج ما با نتایج این محققان نیزانطباق دارد (۲۰). اُکامورا و همکاران اقدام به تشخیص سروتایپ‌های مختلفی از سالمونلا با روش LAMP در جوجه نمودند. آنها در LAMP نتیجه‌ی نهایی را در عرض ۶۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بدست آوردند، در حالی که در PCR بعد از ۱۲۰ دقیقه به نتیجه رسیدند. همچنین حساسیت LAMP را CFU/ml $۱۰^{۳}$ و حساسیت PCR را CFU/ml $۱۰^{۶}$ گزارش نمودند. این محققان برای کوتاه کردن زمان واکنش LAMP از آغازگرهای حلقوی استفاده نموده‌اند و در کمتر از نصف زمان معمول

واکنش قادر به تشخیص شدند. با توجه به اینکه در این تحقیق از آغازگرهای حلقوی استفاده نشده، در زمانی معادل دو برابر زمانی که این محققان گزارش نمودند تشخیص انجام شد. نتایج حساسیت LAMP و PCR مشابه این نتایج بود (۲۷).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این تحقیق روش هم دمایی LAMP در مقایسه با PCR برای تشخیص سالمونلا تیفی و انواع دیگر عوامل عفونی سریع‌تر، ارزان‌تر و اختصاصی‌تر بود. مزیت دیگر این روش عدم وابستگی به چرخه‌های دمایی و دستگاه گران قیمت حرارتی (ترموسایکلر) بوده که به جای آن از یک بستر حرارتی بسیار ساده و ارزان، ساخت داخل کشور استفاده گردید. بنابراین پیشنهاد می‌گردد روش ایزوترمال LAMP را به‌عنوان روش تشخیص مولکولی سریع‌تر، دقیق‌تر و ارزان‌تر در مقایسه‌ی با PCR با کاربرد گسترده در آزمایشگاه‌های تشخیصی پزشکی، پزشکی قانونی، کشاورزی و تحقیقاتی و حتی آزمایشگاه‌های کوچک و سیار بکار برد.

تشکر و قدر دانی

از مسئولین محترم مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...(عج) که در طول انجام این تحقیق حمایت و پشتیبانی فراوانی را مبذول داشتند و همچنین مسئولین محترم دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه زنجان نیز بخاطر همکاری‌های و مساعدت‌های لازم کمال تشکر به عمل می‌آید.

منابع

1- Zahraei T, Salmonella. Tehran: Tehran university publications; 1999.

2- Collier L, Balows A, Sussman M. Topley and wilsons microbiology and microbial infections. London: Arnold; 1998.

3- Soltani MJ, Shahhosseiny MH, shahbazzadeh D, et al. Selective Amplification of prt, tyv and inv A Genes by multiplex PCR for rapid detection of salmonella typhi, *Iranian Biomed J*. 2005; 9: 135-8.

4- Abhyankar A. Salmonellosis and its laboratory diagnosis 2002; Available from: URL: http:// www.Geoities. Com/ avinash abhyankar/

5- Moore P. PCR: replicating success. *Nature*. 2005; 435: 235-8.

6- Hoorfar J, Ahrens P, and Radstrom P. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica*. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 3429-35.

7- Figueroa-Bossi N, Bossi L. Inducible prophages contribute to Salmonella virulence in mice. *Mol Microbiol*. 1999; 33: 167-76.

8- Kumar A, Arora V, Bashamboo A, Ali S. Detection of *Salmonella typhi* by polymerase chain reaction: implications in diagnosis of typhoid fever. *Infect Genet and Evol*. 2002; 2: 107-10.

9- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28: e63.

10- Mori Y, Magamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 289: 150-4.

11- Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes*. 2001; 16: 223-9.

12- Nagamine K, Kuzuhara Y. Isolation of single-stranded DNA from Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) products. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 290: 1195-8.

13- Demidov VV. A new use for old stuff: DNA hairpins in DNA amplification. *Trends in Biotechnol*. 2002; 20: 189-90.

14- Kochl S, Niederstatter H, Parson W. DNA extraction and quntitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. *Methods Mol Biol*. 2005; 297:13-30.

15- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1990; 28; 495-503.

16- karami A, Ranjbar R, Ahmadi Z, Safari Z. Rapid detection of different serovares of *Salmonella entrica* by multiplex PCR. *Iranian J Publ Health*. 2007; 36: 38-42.

17- Karami A, Morrovati S, Ahmadi Z, Safari Z, khalilpour A. Development of an ultra rapid and simple multiplex polymerase chain reaction technique for detection of *Salmonella typhi*. *Saudi Med J*. 2006; 27: 1134-8.

18- Maeda H, Kokeguchi S, Fujimoto C, et al. Detection of periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis by loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005; 43: 233-239.

19- Hara-Kudo Y, Kumagai S, Masuda T, et al. Detection of *Salmonella enteritidis* in shell and liquid eggs using enrichment and plating. *Int J Food Microbiol*. 2001; 64: 395-9.

20- Wang L, Lei S, MJ A, Yuhuan G, Lin L. Specific and rapid detection of foodborne Salmonella by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Research International*. 2007; 41: 69-74.

21- Doran JL, Collinson SK, Burian J, Sarlos G, Todd EC, Munro CK. DNA-based diagnostic tests for Salmonella species targeting agfA, the structurral gene for thin, aggregative fimbriae, *J Clin Microbiol*. 1993; 31:2263-73.

22- Hirose K, Itoh KI, Nakajima H, et al. Selective Amplification of tyv (rfbE), prt (rfbS), viaB and fliC genes by multiplex PCR for identification of Salmonella entrica serovars Typhi and Paratyphi A. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:633-6.

23- Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods*. 2007; 70: 499-501.

24- Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clin Chem*. 2001; 47: 1742-3.

25- Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnol*. 2006; 6: 3.

26- Massi MN, Shirakawa T, Gotoh A, Bishnu A, Hatta M, Kawabata M. Rapid diagnosis of typhoid fever by PCR assay using one pair of primers from flagellin gene of Salmonella typhi. *J Infect Chemother*. 2003; 9:233-7.

27- Okamura M, Ohba Y, Kikuchi S, et al. Loopmediated isothermal amplification for the rapid, sensitive, and specific detection of the O9 group of Salmonella in chickens. *Vet Microbiol*. 2008; 132: 197-204.

Comparison of the PCR and LAMP Techniques in the Diagnosis of Salmonella Infection

Moradi A[1], Karami A[2], Hagh Nazari A[3], Ahmadi Z[4], Soroori Zanjani R[2], Javadi SM[1]

[1]Zanjan University, Group of Biotechnology, Zanjan, Iran

[2]Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

[3]Zanjan University, Faculty of Agricultural Sciences, Zanjan, Iran

[4]Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Karami A, Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: Karami@bmsu.ac.ir

Received: 5 May 2008 **Accepted:** 18 May 2009

***Background and Objective*:** There are several techniques for the diagnosing of salmonella infectious. Several molecular methods such as PCR and hybridization assay have recently been used for the detection of this bacterium. However, these methods require precision instruments for amplification and complex procedures, which are the major obstacles to the widespread use of these methods in relatively small scale clinical laboratories, clinics and the filed laboratories. Recently, a new, rapid and sensitive technique called loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was developed.

Materials and Methods: In this study we used 7 different strains of salmonella to compare the PCR with LAMP method. For PCR test we used thermocycler, but The LAMP reaction can be conducted under isothermal conditions by using only one type of enzyme and four primers recognizing six distinct regions. The most important merit of this method is that no denaturation of the DNA template is required, so, technique is simple and no need to thermocycler machine and several temperatures cycles.

Results: Conventional PCR method for the detection of *Salmonella* with standard thermocylcer takes 3 hrs but, with LAMP method we were able to amplify and detect the salmonella in very simple thermal block made in IRAN. After Optimization of the process it was possible to rapidly detect and identify *Salmonella typhi* bacteria within 90 minutes. This method was also 100 times more sensitive comparing to the PCR method.

Conclusion: According to the results, comparing LAMP isothermal amplification method for detection and identification of Salmonella with conventional PCR we have been able to determine the simplicity, speed (3 times) and the superior sensitivity(100 times) of the LAMP to PCR method. This Method is more simple, faster and cheaper (10 times). Another advantage is independence to cycle's temperature and thermo-cycling and replacement with one thermo block which is very simple, inexpensive and made in inside the country.

Key words: Salmonella, Isothermal, PCR, DNA, LAMP