معرفی روش

دارای رتبه علمی-پژوهشی
ازکمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

معرفی یک نسخه ساده از روش Van Erth در مطالعه SNP typing *باسیلوس آنتراسیس* سازگار با ماشین های ترموسایکلر معمولی

زهرا نجفی علیا
دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
کیوان تدین
استادیار میکروب شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
راياناک قادری
دکترای میکروب شناسی دامپزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

نویسنده مسئول: کیوان تدین

پست الکترونیک: k.tadayon@rvsri.ac.ir

تلفن :۰۹۱۲۴۹۶۸۹۰۷

آدرس: مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

دریافت: ۹۳/۳/۱
ویرایش پایانی: ۹۳/۳/۱۹
پذیرش: ۹۳/۳/۲۱

چکیده

در ژنوتایپینگ باسیلوس آنتراسیس، Single Nucleotide Polymorphism (SNP) typing یکی از روش های شناخته شده بین المللی می باشد. در روش استاندارد Van Erth موجودیت SNPs در ۱۳ منطقه از ژنوم باکتری مورد بررسی قرار می گیرد. با هدف تسهیل روش پیشنهادی Van Erth و سازگار نمودن آن برای استفاده در آزمایشگاه های با بودجه محدود ۱۳ زوج پرایمر متناسب با ۱۳ لوکوس SNP طراحی شدند. علاوه بر این یک پروتکل واحد از نظر دما و اجزاء PCR تهیه و تکمیل گردید که تکثیر همزمان همه لوکوس ها توسط ماشین های ترموسایکلر کلاسیک را به سادگی امکان پذیر نمود. کارایی این روش در عمل از طریق اعمال موفقیت آمیز آن بر روی ۹ جدایه باسیلوس آنتراسیس نشان داده شد. ما استفاده از این روش اصلاح شده را تا زمان توسعه و تکمیل روش های جدیدتر مقرون به صرفه به عنوان جایگزین روش پیشنهادی Van Erth توصیه می نماییم.

واژه های کلیدی: *باسیلوس آنتراسیس، ژنوتایپینگ، SNPs، PCR*

آدرس مقاله
نجفی علیا ز، تدین ک، قادری ر" معرفی یک نسخه ساده از روش Van Erth در مطالعه SNP typing *باسیلوس آنتراسیس* سازگار با ماشین های ترموسایکلر معمولی" مجله علوم آزمایشگاهی، فروردین و اردیبهشت۹۴، دوره نهم (شماره ۱): ۹۷-۱۰۳

مقدمه

بر اساس برآوردهای رسمی موجود تعداد موارد انسانی آنتراکس در مقیاس جهانی بین ۲ تا ۲۰ هزار مورد در هر سال تغییر می نماید(۱). در سال های اخیر با توجه به اهمیت جهانی آنتراکس مطالعات دامنه دار و گسترده ای در ارتباط با اپیدمیولوژی *باسیلوس آنتراسیس* با استفاده از روش های ملکولی نظیر multiple-locus variable-number tandem analysis (MLVA) و Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Typing صورت پذیرفته است. بر همین اساس اکنون توالی ژنتیکی کامل بیش از۷ سویه *باسیلوس آنتراسیس* و از جمله سویه واکسینال *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 و همچنین سویه حاد *B. anthracis* Ames در دسترس می باشد. توسعه و تکمیل روش های ملکولار ژنوتایپینگ *باسیلوس آنتراسیس* زمینه گشایش افق های تازه ای را در شناخت درست اپیدمیولوژی آنتراکس فراهم نموده است که پیش از این دستیابی به آنها امکان پذیر نبوده است. پیش از این کاربرد روش استاندارد ژنوتایپینگ MLVA با استفاده از ۸ لوکوس(vrrA, vrrB1,vrrB2,vrrC1,vrrC2,CG3, pxO1-aat, pxO2-at) توسط مؤذنی جولا بر روی مجموعه ای از ۱۶ جدایه ایرانی *باسیلوس آنتراسیس* همراه با سویه خارجی واکسینال *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 وجود ۷ تیپ ژنتیکی را در ایران نشان داده است (تدین، اطلاعات منتشر نشده). در حال حاضر ساختار ژنتیکی *باسیلوس آنتراسیس* های موجود در این آرشیو میکروبی با استفاده از روشSNP Typing در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در حال بررسی تکمیلی می باشد. در این روش تایپینگ که در اساس توسط van Erth در سال ۲۰۰۷ ابداع و تکمیل گردید تعداد ۱۳ لوکوس ژنتیکی از ژنوم *باسیلوس آنتراسیس* که دارای نقاط SNP به نام های مشخصه A.Br.001, A.Br.002, A.Br.003, A.Br.004, A.Br.006, A.Br.007, A.Br.008, A.Br.009, B.Br.001, B.Br.002, B.Br.003, B.Br.004, A/B.Br.001 می باشند، انتخاب و نوکلئوتید مشخص در هر SNP به روش تعیین توالی شناسایی می گردد (۱). در نهایت با تجمیع یافته های مربوط به۱۳ لوکوس در هر جدایه/سویه تیپ ژنتیکی SNP تعیین می گردد. در روش پیشنهادی van Erth پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ۱۳ لوکوس به گونه ای طراحی شده اند که اندازه قطعات حاصل از انجام تکثیر کوچک تر از ۱۰۰ زوج باز می باشد (جدول ۱). جداسازی و تخلیص اینگونه قطعات پس از تکثیر و همچنین تعیین توالی نوکلئوتیدی آن ها با ماشین های متعارف تعیین توالی معمولاً با اشکال همراه می باشد. علاوه بر این، روش van Erth با استفاده از تجهیزات و تکنیک های پرهزینه نظیر تعیین توالی نوکلئوتیدی به روش اسپکترومتری جرمی توسط محققین مختلف انجام پذیرفته است که دسترسی به این تجهیزات در توان آزمایشگاه های تحقیقاتی کشورهای در حال توسعه نمی باشد. در مطالعه حاضر چگونگی اعمال تغییرات تکنیکی شرح داده می شود که با استفاده از آن ها می توان تمام ۱۳ لوکوس معرفی شده van Erth را با استفاده از روش PCR کلاسیک و به کارگیری یک روش کار واحد به گونه ای تکثیر نمود که محصولات به دست آمده آماده انجام آزمون تعیین توالی باشند.

روش بررسی

علاوه بر سویه واکسینال *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 که به عنوان سویه استاندارد برای اجرای آزمون در نظر گرفته شد تعداد ۱۲ جدایه *باسیلوس آنتراسیس* جمع آوری شده از خاک مراتع و همچنین دامداری های مناطق مختلف ایران و همچنین موارد بیماری در انسان و دام موجود در آرشیو میکروبی مؤسسه رازی به منظور ارزیابی کارایی یافته های مطالعه مورد تحقیق قرار گرفتند. این جدایه ها پیش از این به روش های استاندارد میکروبیولوژیکی، بیوشیمیایی و همچنین ملکولی از نظر هویت مورد بررسی قرار گرفته و موجودیت آن ها به عنوان *باسیلوس آنتراسیس* تأیید گردید.

کشت باکتری: برای کشت باکتری در مورد سویه واکسینال، یک بطری واکسن زنده شاربن ساخت مؤسسه رازی بخوبی تکان داده شد و سپس در شرایط سترون ۱ میلی لیتر از محتویات آن بر روی یک پلیت (به قطر ۱۰ سانتیمتر) محیط مغذی آگار خوندار به گونه ای کشت داده شد که تمام سطح پلیت تلقیح گردد. ظرف کشت سپس به گرمخانه انتقال و به مدت ۱۵ ساعت در دمای $37\ ^{\circ}C$ نگهداری گردید.

در مورد جدایه های حاد *باسیلوس آنتراسیس* از روش مشابه سویه واکسینال استفاده گردید با این تفاوت که به جای بطری واکسن از میکروفیوژهای محتوی سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی استفاده گردید و تحت شرایط استریل پس از هم زدن محتویات، یک لوپ یکبار مصرف (10 µl) به سوسپانسیون باکتری آغشته و از آن برای تلقیح پلیت آگار خوندار استفاده شد. استخراج ژنوم باکتری به روش جوشانیدن انجام گردید. به همین منظور معادل یک لوپ کامل از کشت ۱۴ ساعته باکتری برداشت و به 400 µl بافر تجارتی TB-lysis در یک میکروتیوب انتقال داده شد. به کمک یک وزنه فلزی مناسب میکروتیوب در کف محفظه یک بن ماری محتوی آب در حال جوش (96 °C) قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در همین وضعیت نگه داشته شد تا باکتری های انتقال داده شده در فرم رویشی بطور کامل غیر فعال گردند. در مرحله بعد میکروتیوب در g ۹۷۵۰به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع شناور سطحی محتوی ژنوم باکتری از فیلتر سرسرنگی ۰/۲ میکرولیتر عبور داده شد. میزان µl ۱۰از سوسپانسیون به دست آمده بر روی یک پلیت محیط مغذی آگار خوندار کشت و به کمک لوپ یکبار مصرف تمام سطح محیط کشت تلقیح گردید. ظرف کشت به گرمخانه $37\ ^{\circ}C$ انتقال و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و از نظر وجود هر نوع نشانه مبتنی بر رشد احتمالی *باسیلوس آنتراسیس* مورد توجه قرار گرفت. سوسپانسیون های محتوی ژنوم استخراج شده باکتری پس از اطمینان از غیر فعال شدن کامل همه باسیل های شاربن تا زمان مصرف در یخچال شدند.

طراحی پرایمر: ژنوم کامل سویه *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 (قابل دسترسی از) با استفاده از برنامه Artemis (۱۰) مورد جستجو قرار گرفت و موقعیت مکانی تمام ۱۳ لوکوس معرفی شده توسط van Erth بر اساس پرایمرهای پیشنهاد شده مکان یابی گردید. حدود 2Kb از ژنوم باکتری در محدوده هر لوکوس به گونه های انتخاب گردید که لوکوس مورد نظر تقریباً در میانه قرار داشته باشد. طراحی پرایمر برای هر لوکوس به صورت مستقل با استفاده از برنامه Primer 3 (۱۲،۱۱) صورت پذیرفت و در تنظیمات برنامه، اندازه محصول PCR در محدوده ۷۰۰–۴۵۰ زوج باز تعریف گردید. آزمون های ملکولی از کیت تجارتی آمپلیکون از محصولات شرکت آمپلیکور (Ampliquor®, Denmark) برای اجرای تمام آزمون های PCR استفاده شد. این کیت محتوی آنزیم تک پلی مراز، نوکلئوتیدهای چهارگانه، کلرید منیزیوم و سایر املاح متعارف مورد نیاز برای PCR می باشد. برای هر لوکوس چهار برنامه تنظیم گردید به گونه ای که هر برنامه شامل ۶ واکنش PCR مترادف با ۶ دمای مختلف annealing (۵۵، ۵۶/۷، ۵۹/۱، ۶۰/۴ ، ۶۲/۹ و ۶۴/۹ درجه سانتیگراد) اجرا گردید . علاوه بر این در دو آزمون میزان پرایمر مصرفی (مقادیر ۱ و یا ۵ پیکومول) و در دو آزمون دیگر میزان کلرید منیزیوم (۱mM یا ۲/۵mM) به عنوان متغیر اعمال گردید. پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen®, Korea) ساخته شدند. تهیه و آماده سازی واکنش های PCR به صورت master mix صورت پذیرفت. حجم اجزاء تمام واکنش ها در تمام آزمون ها به ترتیبی تنظیم گردیدند که حجم نهایی هر واکنش برابر با ۱۲ µL تنظیم شد(جدول۲). به عنوان کنترل منفی از Double Distilled PCR water, PCR master mix with no DNA template حسب نیاز استفاده گردید. برای الکتروفورز محصولات PCR از ژل ۱/۵ درصد آگاروز از درجه مولکولار بیولوژی (Invitrogen®, USA) از پیش رنگ شده با Red® Safe استفاده شد. پس از بارگذاری، ژل ها در میدان الکتریکی به مدت ۲ ساعت در میدان الکتریکی به قدرت ۲ V/cm رانده و سپس در دستگاه ژل داک (BioRad®, USA) مورد تصویر برداری قرار گرفتند. با مقایسه باندهای مشاهده شده هر لوکوس با باندهای DNA size marker استاندارد 100 bp (Invitrogen®, USA) اندازه تقریبی محصولات PCR مشخص گردید. نتایج تصویری مربوط به آزمون های چهارگانه هر لوکوس به صورت مستقل و یافته های تمام ۱۳ لوکوس به صورت تجمیعی مورد بازبینی قرار گرفتند و یک برنامه واحد قابل اجرا از نظر دما و غلظت اجزاء مهم متغیر سازنده (منیزیوم کلراید و پرایمرها) برای همه لوکوس ها تنظیم گردید (جدول ۲). از این برنامه واحد برای تکثیر هر ۱۳ لوکوس ژنوم سویه واکسینال *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 و علاوه بر آن تعداد ۱۲ جدایه حاد *Bacillus*

anthracis موجود در آرشیو میکروبی موسسه رازی استفاده شد. به منظور اطمینان از درستی عملکرد برنامه به دست آمده توالی نوکلئوتیدهای محصولات آمپلی فیکاسیون مربوط به هر ۱۳ لوکوس توسط آزمایشگاه شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین گردید. نتایج با استفاده از نرم افزارهای Clustal (۱۳) و Chromas پردازش و همخوانی آنها با مناطق هم ارز از ژنوم معرفی شده *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 مقایسه گردید.

جدول۱- لوکوس ها و پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق و همچنین مطالعه Van Erth. طول محصولات حاصل از آمپلی فیکاسیون هر لوکوس (در مقیاس زوج باز) و موقعیت مکانی آنها بر اساس ژنوم *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 مشخص گردیده است.

نام لوکوس	پرایمر ('3'-5') مورد استفاده در مطالعه van Erth	اندازه محصول PCR (زوج باز) (موقعیت مکانی	پرایمر ('3'-5') مورد استفاده در مطالعه حاضر	اندازه محصول PCR (زوج باز) (موقعیت مکانی
A.Br.001	f) CAA GCG GAA CCA AAT TTA ATC TTT	۸۹ (-۱۸۲۱۵۷	f) TTA CAG TGC CGC CAA AGA CA	۶۰۸ (-۱۸۲۳۸۰
	r) TTC ACC GTA CGT CAT	۱۸۲۰۶۸)	r) CCC ACT CAG TCG	۱۸۱۷۷۲)
A.Br.002	f) AAC GAT ACC TAA AAT CGA TAA AG	۲۶ (-۹۴۷۶۶۸	f) TAG AGA TGT GGT CGC GAA GT	۶۶۹ (-۹۴۷۹۷۵
	r) GGC AGA AGG AGC AAG	۹۴۷۶۴۲)	r) AGC TTC AAA GAG TCC	۹۴۷۳۰۶)
A.Br.003	f) GCT ACT GTC ATT GTA TAA AAA CCT CCT TT	۵۵ (-۱۴۹۳۲۴۳	f) TCG TCA AGG AAT CGG ACG TT	۶۱۴ (-۱۴۹۳۶۳۴
	r) CGC TTG CCA AGC TTT TTT	۱۴۹۳۱۸۸)	r) CGA GCT TCT TCC CAC	۱۴۹۳۰۲۰)
A.Br.004	f) CCG ATA CCA GTA AAC GAC GAC AT	۷۵ (-۳۶۰۱۳۹۲	f) AAT AAG TGG CGC TGC CGT AT	۵۵۷ (-۳۶۰۱۵۸۲
	r) CTG GAA TTG GTG GAG	۳۶۰۱۳۱۷)	r) CAG ATG GAT CGC GTT	۳۶۰۱۰۲۵)
A.Br.006	f) CCG GAA ATT GCT ATT AGA ACG AA	۱۳۶ (-۱۶۲۵۴۹	f) ATG GAT GAA AAT GAT CAG CCG C	۵۱۳ (-۱۶۲۷۴۹
	r) TCC CAA TCT AGC GTT	۱۶۲۴۱۳)	r) CAG CAA TCT CCC CTT	۱۶۲۲۳۶)
A.Br.007	f) TTG GTA ACG AGA CGA TAA ACT GAA TAA	۵۸ (-۲۶۶۴۶۴	f) TAG TAC CGC AAG CGG AAG AG	۵۴۰ (-۲۶۶۶۳۲
	r) GCC TTG GAT TGG CGA	۲۶۶۴۰۶)	r) TGT CAT CGG CGA CTT	۲۶۶۰۹۲)
A.Br.008	TTC GCA ACT ACG CTA TAC GTT TTA GAT	۲۸ (-۳۹۴۷۷۶۲	f) CGC CAA ACG ATG CAA ACT CA	۴۵۸ (-۳۹۴۷۹۲۷
	CAA ACG GTG AAA AAG TTA	۳۹۴۷۷۳۴)	r) ACC ATC GAT TGG CTG	۳۹۴۷۴۶۹)
A.Br.009	f) GGC AAT CGG CCA CTG TTT	۱۰۰ (-۲۵۹۰۳۵۳	f) TCC CCT AAT GGA ATA CGC GG	۵۴۵ (-۲۵۹۰۵۷۹
	r) GGG TTT CTA CTG TGTA TGT TGT TAA TAA AAA	۲۵۹۰۲۵۳)	r) GCG CTT CGA ATT GGT	۲۵۹۰۰۳۴)
B.Br.001	f) TGC ATG CTT CTT CTT ACA GAG TAG TTA AT	۴۹ (-۱۴۵۵۳۸۸	f) GTT CTG GTG CTG CAT TTG GTA	۵۹۹ (-۱۴۵۵۶۵۴
	r) CGG TCA TAA AAG AAA	۱۴۵۵۳۳۹)	r) ACG CTT CAT CCG TAA	۱۴۵۵۰۵۵)
B.Br.002	f) TGT TGC ACC TTC TGT GTT CGT T	۳۶ (-۱۰۵۶۶۴۶	f) AAC GAA GGG GAC AGT GGA AG	۶۱۰ (-۱۰۵۶۸۸۴
	r) GTA GTG GCT TCA CCG	۱۰۵۶۶۱۰)	r) TCC CGT TGT AAG	۱۰۵۶۲۷۴)
B.Br.003	f) CAT TTA TTC GCA TAG AAG CAG ATG A	۸۸ (-۱۴۹۴۳۹۴	f) TTT CCG TAT GGC TGT GTT TGG	۴۷۹ (-۱۴۹۴۵۱۶
	r) TGT GCC ATC AAA TAA CTC	۱۴۹۴۳۰۶)	r) CCA AAT GAA CCA CCA	۱۴۹۴۰۳۷)
B.Br.004	f) GAA GTT AAG TAT CAA CCA GCA GAA GAA A	۱۲۱ (-۷۰۰۱۶	f) GTT TAT GCC GTG AGA GGA GGT	۶۱۹ (-۷۰۱۹۷
	r) CCG CCG CCT GAG CTT	۶۹۸۹۵)	r) AAC ACC CTT CGG AAT	۶۹۵۷۸)
A/B.Br.001	f) GAA GGT CTC CAA TTT GGA TTT AAA AT	۱۲۰ (-۳۶۹۸۶۳۴	f) TGG GCG TCG TTA CAA CTT CT	۵۹۹ (-۳۶۹۸۷۷۰
	r) CGT GTG AAC CTT TCG GTA AAT AGT C	۳۶۹۸۵۱۴)	r) CCA GCA AGC GAT ATA CCG GA	۳۶۹۸۲۰۰)

جدول ۲- اجزاء سازنده و برنامه دماهای مورد استفاده در پروتکل های PCR مورد استفاده در این تحقیق

PCR protocol	PCR master mix (µl)	Primer forward[1] (µl)	Primer reverse[1] (µl)	$MgCl2^{2}$ (µl)	DNA template (µl)	PCR water (µl)	Total volume (µl)
۱	٦	۰/۷۵	۰/۷۵	۰	۲	۲/۵	۱۲
۲	٦	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۳٦	۲	۲/۱٤	۱۲
۳	٦	۰/۱۵	۰/۱۵	۰	۲	۳/۷	۱۲
٤	٦	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۳٦	۲	۳/۳٤	۱۲
Universal	٦	۰/۲	۰/۲	۰	۱/۵	٤/۱	۱۲

جدول ۲- اجزاء سازنده و برنامه دماهای مورد استفاده در پروتکل های PCR مورد استفاده در این تحقیق.

PCR protocol	Initial Denaturation s/°C	Number of cycles	Denaturation s/°C	Annealing s/°C	Extension s/°C	Final Elongation s/°C
Universal	۳۰۰/۹۵	۳۵	۳۰/۹۵	٤۵/٦۵	٤۵/۷۲	٦۰۰/۷۲

1) From 25 mM stock solution

2) From 5 pmol/ **µl** stock solution

یافته ها

آزمون های PCR چهارگانه (مجموعاً ۲۴ واکنش برای هر لوکوس) در مورد هر ۱۳ لوکوس به صورت مستقل با موفقیت اجرا گردیدند. دستیابی به یک برنامه واحد مشترک از نظر دما و اجزاء سازنده با توجه به یافته های مستقل ۱۳ لوکوس امکان پذیر گردید و در عمل همه لوکوس ها با موفقیت در جریان یک فرآیند PCR تکثیر گردیدند. محصولات ۱۳ گانه با موفقیت در آزمایشگاه همکار تعیین توالی نوکلئوتیدی شدند و بررسی مقایسه ای آنها با ژنوم سویه استاندارد *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 نشان دهنده مطابقت کامل محصولات با قطعات هم ارز در ژنوم این سویه بود. تکثیر لوکوس های ۱۳ گانه در تمام ۱۲ جدایه حاد با استفاده از برنامه به دست آمده PCR با موفقیت صورت پذیرفت.

بحث

اهـــمیت *باسیلوس آنتراسیس* به عـــنوان یـکی از مناسب تـــرین ارگـــانیزم هـای قابل استفاده در فعالیت های خرابکارانه تروریستی، بر اهمیت شناخت درست از اپیدمیولوژی و تنوع ژنتیکی این باکتری می افزاید. در جریان استخراج ماده ژنتیکی *باسیلوس آنتراسیس* در مطالعه حاضر پس از غیر فعال نمودن باکتری توسط حرارت سوسپانسیون به دست آمده از فیلتر µl ۰/۲ گذرانیده شد تا هرگونه احتمال بقاء باکتری در شکل هاگ از بین برده شود. تجربه آزمایشگاهی مؤلفین ضرورت انجام این اقدام احتیاطی را از نظر ایمنی کاربران تأیید می نماید اگرچه ضرورت و اهمیت انجام این عمل در برخی از موارد کمتر مورد توجه محققین قرار گرفته است (۱۴). طراحی پرایمرهای مورد استـفاده در این تحـقیق به گـونه ای صورت پذیرفته است که اندازه تمام قطعات مورد انتظار در محدوده ۷۰۰-۴۵۰ زوج باز می باشد که بدین ترتیب شناسایی آنها در جریان ژل الکتروفورز را آسان تر می نماید. یکی از شاخص ترین یافته های کاربردی این تحقیق توانایی توسعه یک برنامه واحد PCR می باشد که هم از نظر اجزاء و هم از نظر دما امکان اجرای ۱۳ واکنش متفاوت را به صورت

همزمان در یک دور فعالیت ماشین PCR فراهم می نماید. این درحالی است که در اجرای روش van Erth برخی از محققین دیگر از بیش از یک برنامه برای تکثیر قطعات ژنتیکی مورد نظر استفاده نموده اند.

نتیجه گیری

یافته مهم این تحقیق را در ساده سازی روش Van Erth در مطالعه SNP typing *باسیلوس آنتراسیس* بیان نمود که برخلاف روش اصلی، انجام *آن* بدلیل استفاده از دستگاه های متعارف ترموسایکلر در اکثر آزمایشگاه های میکروب شناسی قابل اجرا می باشد.

تشکر و قدردانی

هــزینــه های مــربوط به انجـام این تحقیق به طور کامل توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و در قالب یک پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۲۱۰۷- ۱۸-۱۸-۲ تامین گردیده است. زهرا نجفی علیا در حال حاضر دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی پزشکی مؤسسه رازی می باشد و این مقاله ناظر بر بخشی از یافته های پروژه کارشناسی ارشد نامبرده می باشد. از غلامرضا مؤذنی جولا و حسین رزاز به جهت فراهم نمودن تعدادی از جدایه های مورد استفاده در این تحقیق تشکر می گردد. مؤلفین مراتب قدرشناسی و سپاس خود را نسبت به Paul Keim و Talima Pearson از دانشگاه ایالتیآریزونای شمالی آمریکا به واسطه نظرات کارشناسی سازنده و همکاری ایشان در پیشبرد این پژوهش اعلام می نمایند.

References

1. Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, Okinaka RT, Hugh-Jones ME, Ravel J, et al. *Global genetic population structure of bacillus anthracis.* PLoS One. 2007; 2(5): e461.

2. Jula GM, Sattari M, Banihashemi R, Razzaz H, Sanchouli A, Tadayon K. *The phenotypic and genotypic characterization of bacillus anthracis isolates from iran.* Trop Anim Health Prod. 2011; 43(3): 699-704.

3. Joshi SG, Cymet HB, Kerkvliet G, Cymet T. *Anthrax in america 2001-2003.* J Natl Med Assoc. 2004; 96(3): 344-50.

4. Hoffmaster AR, Fitzgerald CC, Ribot E, Mayer LW, and Popovic T. *Molecular subtyping of bacillus anthracis and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, united states.* Emerg Infect Dis. 2002; 8(10): 1111-6.

5. Okinaka RT, Henrie M, Hill KK, Lowery KS, Van Ert M, Pearson T, et al. *Single nucleotide polymorphism typing of bacillus anthracis from sverdlovsk tissue.* Emerg Infect Dis. 2008; 14(4): 653-6.

6. Wilkening DA. *Sverdlovsk revisited: Modeling human inhalation anthrax.* Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103(20): 7589-94.

7. Palmateer NE, Hope VD, Roy K, Marongiu A, White JM, Grant KA, et al. *Infections with spore-forming bacteria in persons who inject drugs, 2000-2009.* Emerg Infect Dis. 2013; 19(1): 29-34.

8. Hiendleder S, Kaupe B, Wassmuth R, Janke A. *Molecular analysis of wild and domestic sheep questions current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies.* Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. 2002; 269(1494): 893-904.

9. McNeill JR. *Europe's place in the global history of biological exchange.* Landscape Research. 2003; 28(1): 33-39.

10. Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA. *Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data.* Bioinformatics. 2012; 28(4): 464-9.

11. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, and Rozen SG. *Primer3--new capabilities and interfaces.* Nucleic Acids Res. 2012; 40(15): e115.

12. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, and Madden TL. *Primer-blast: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction.* BMC Bioinformatics. 2012; 13: 134.

13. McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, et al. *Analysis tool web services from the embl-ebi.* Nucleic Acids Res. 2013; 41(Web Server issue): W597-600.

14. Aikembayev AM, Lukhnova L, Temiraliyeva G, Meka-Mechenko T, Pazylov Y, Zakaryan S, et al. *Historical distribution and molecular diversity of bacillus anthracis, kazakhstan.* Emerg Infect Dis. 2010; 16(5): 789-96.

A Simplified Van Erth Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Typing Method of *Bacillus Anthracis Applicable by* Traditional Thermocycler Machines

Najafi Olya, Z. (BSc)
MSc Student of Microbiology, Department of Veterinary Aerobic Bacteria, Razi Institute, Karaj, Iran

Tadayon, K. (PhD)
Assistant Professor of Microbiology, Razi Institute, Karaj, Iran

Ghaderi, R. (PhD)
PhD of Microbiology, Department of Veterinary Aerobic Bacteria, Razi Institute, Karaj, Iran

Corresponding Author: Tadayon, K.

Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir

Received: 22 May 2014
Revised: 9 Jun 2014
Accepted: 11 Jun 2014

Abstract

SNP typing is now a well-established genotyping system in *Bacillus anthracis* studies. In the original standard method of Van Erth, SNPs at 13 loci of the *B. anthracis* genome were analyzed. In order to simplify and make appropriate this expensive method to low-budget laboratory settings, 13 primer pairs targeting the 13 corresponding SNPs were designed. Besides, a universal PCR protocol was developed to enable simultaneous amplification of all loci by conventional PCR machines. The efficiency of this approach was approved by applying on nine isolates of B. *anthracis*. We recommend using this modified procedure as an efficient alternative to Van Erth method until developing newer and affordable techniques.

Keywords: Bacillus Anthracis, Genotyping, SNPs, PCR

This paper should be cited as: Najafi Olya Z, Tadayon K, Ghaderi R. [A Simplified Van Erth Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Typing Method of Bacillus Anthracis Applicable by Traditional Thermocycler Machines]. mljgoums. 2015; 9(1): 97-103[Article in Persian]