جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۰، شماره‌ی ۸۰، مرداد و شهریور ۱۳۹۱، صفحات ٦٤ تا ۷۵

بررسی کارایی تکنیک تکثیر دایره‌ای چرخان برای تشخیص سریع قارچ کلادوفیالوفورا کاریونی و کلادوفیالوفورا یگرزی

حسین حمزه‌یی[۱]، دکتر حمید بدلی[۲]، دکتر مهدی رهنما[۳]، محسن اجلی[۱]
نویسنده‌ی مسوول: زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان badalii@yahoo.com

دریافت: ۹۰/۸/۲۲ پذیرش: ۹۱/۱/۱۹

چکیده

زمینه و هدف: *روند مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که نه تنها بیماری‌های قارچی به طور قابل چشم‌گیری به‌خصوص در بیماران با نقص سیستم ایمنی در حال افزایش است، بلکه کاهش حساسیت عوامل قارچی به داروهای ضد قارچی نیز در حال افزایش می‌باشد. بنابراین تشخیص سریع و زود هنگام در حد گونه برای انتخاب داروی مناسب و مدیریت بالینی ضروری است. با این وجود روش‌های استاندارد تشخیصی وقت‌گیر، هزینه بر و از حساسیت کمی برخوردار می‌باشند لذا برای فایق آمدن بر هر کدام از مشکل های ذکر شده، ابزارهایی مبتنی‌بر PCR توسعه یافته‌اند. در این مطالعه از روشی که علی‌رغم سرعت بالا از حساسیت بالایی برخوردار بوده به نام تکنیک تکثیر دایره‌ای چرخان برای تشخیص دقیق‌تر و صحیح‌تر دو گونه قارچی کلادوفیالوفورا کاریونی و کلادوفیالوفورا یگرزی استفاده شد.*

روش بررسی: *در این بررسی به‌طور اختصاصی از ناحیه‌ی رونویسی داخلی (ITS rDNA) از مجموعه‌ی ژنی DNA های ریبوزومی جنس کلادوفیالوفورا که قبلا تعیین توالی شده بودند، استفاده گردید و پروب‌های اختصاصی بر اساس تفاوت تنها در یک نوکلئوتید از ناحیه‌ی ITS rDNA برای قارچ‌های کلادوفیالوفورا کاریونی و کلادوفیالوفورا یگرزی طراحی گردید. پروب‌ها در اصل توالی مکمل هدف منتهی به جایگاه لینکر می‌باشد که پس از هیبریداسیون با DNA به شکل یک مولکول بسته در آمده، با اتصال به هدف و تکثیر در شرایط تک دمایی مورد ارزیابی قرارگرفت.*

یافته‌ها: *نتایج این تحقیق یک تکثیر DNA کاملا موفق را بدون نتایج مثبت و منفی کاذب و تشخیص در حد گونه نشان داد. محصول نتایج RCA در ژل آگارز ۱/۵ درصد به‌صورت نردبانی نشان داده‌شد و واکنش مذکور در جهت تکثیر DNAی هدف به طور اختصاصی در اتصال با پروب در کمترین زمان نسبت به روش‌های متداول تایید گردید.*

نتیجه‌گیری: *نتایج نشان دهنده‌ی قدرت و دقت این تکنیک در شناسایی عوامل بیماری‌زای قارچی در حد گونه با سرعت و اختصاصیت بسیار بالا در مقایسه با روش‌های شناسایی قدیمی می‌باشد و این تکنیک می‌تواند کابرد فراوانی در کلیه‌ی آزمایشگاه‌های تشخیصی داشته باشد بنابراین RCA تفاوت بسیار چشمگیری را با دیگر تکنیک‌های وابسته به دما بر پایه‌ی DNA برخوردار می‌باشد.*

واژگان کلیدی: تکثیر دایره‌ای چرخان، کلادوفیالوفورا کاریونی، کلادوفیالوفورا یگرزی، کروموبلاستومایکوزیس

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
۲- دکترای تخصصی قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان
۳- دکترای تخصصی فیزیولوژی، دانشیار مرکز تحقیقات بیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

کلادوفیالوفورا از جنس قارچ‌های شبه مخمری سیاه متشکل از تعدادی گونه‌های کلینیکی مهم و سویه‌های محیطی قابل توجه تشکیل شده است. گونه‌های این قارچ اغلب باعث ایجاد عفونت در انسان می‌شود و باعث به‌وجود آمدن ضایعات پوستی خفیف تا آنسفالیت کشنده می‌گردد. گونه‌ی کاریونی از کلادوفیالوفورا عامل کروموبلاستومایکوزیس پوستی و زیرجلدی و باعث بیماری سیتولوژیک توسط موری فورم سل‌ها (Muriform Cells) در بافت پوست می‌شود (۴-۱). این بیماری انتشار جهانی داشته ولی در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری شایع‌تر می‌باشد و در مردان شایع‌تر از زنان است. تلقیح تروماتیک با عوامل بیماری‌زا مهم‌ترین عامل عفونت تلقی می‌شود. بررسی و تشخیص عامل این بیماری بر اساس تکنیک‌های معمول بسیار وقت گیر و تفکیک آن از سایر گونه‌ها مشکل است از آن‌جایی‌که در بررسی‌های میکروسکوپی عامل اتیولوژیک بیماری در حد جنس و گونه شناسایی نمی‌شود، نمونه‌ی اخذ شده از محل ضایعه در داخل محیط کشت سابورو دکستروز آگار تلقیح و در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری می‌شود (۲و۱). محیط کشت حداقل به‌مدت ۴ هفته از نظر رشد قارچی تحت بررسی قرار می‌گیرد. در کشت انجام شده کلنی‌های کپکی به رنگ قهوه‌ای زیتونی تا سیاه مشاهده می‌شود. تشخیص جنس و گونه قارچ مشکل است زیرا این قارچ‌ها روش‌های مختلفی برای اسپورزایی از خود نشان می‌دهند (۵و۲،۱). طی مطالعات مولکولی گسترده‌ای که توسط بدلی و همکاران در تشخیص گونه‌های کلادوفیالوفورا انجام گردید. شباهت ژنوتیپی گونه‌ی *C. yegresii* با *C. carrionii* به‌حدی زیاد بوده که به‌عنوان گونه‌ی خواهری از *C. carrionii* در طبقه بندی فیلوژنیکی گزارش شده است (۷و۶). کلادوفیالوفورا یگرزی در سال ۲۰۰۷ توسط دی‌هوگ وهمکاران از کاکتوس جداسازی شد و بیماری‌زایی آن هنوز به اثبات نرسیده است (۷و۶). امروزه با افزایش کیفیت استانداردهای بهداشتی لزوم به پیشگیری و نهایتا درمان سریع بیماری اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. در این راستا یکی از ابزارهای مهم، تشخیص به موقع و دقیق می‌باشد که یکی از عوامل اصلی کنترل کیفی در کلیه‌ی زمینه‌های بهداشتی و درمانی است. با پیشرفت های انجام شده در علم ژنتیک راه‌کارهایی در پیش روی محققین قرارگرفته است که توسط آن توانسته‌اند قدم‌های بسیار بلندی در امر تسریع کنترل کیفی و تشخیص بیماری بردارند. یکی از تحولات عظیم در بحث ژنتیک و به تبع آن تشخیص طبی، اختراع روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز می‌باشد (۹و۸). با این وجود به تکنیک PCR نیز اشکالاتی وارد است که از آن جمله می‌توان به لزوم وجود دستگاه گران قیمت ترمال سایکلر، وقت‌گیر بودن تکنیک، احتمال آلودگی و ایجاد واکنش‌های ناخواسته، عدم امکان اجرای تکنیک در شرایط آزمایشگاهی معمول، عدم تشخیص اختصاصی در حد گونه و پایین بودن حساسیت و همینطور پیچیدگی روش کار اشاره کرد که هر کدام محدودیت‌هایی را در پیش‌پای متخصصین قرار داده است (۱۲-۱۰). خوشبختانه با ایجاد پایگاه داده‌های ژنی (Gene Bank) و پروتئینی محققین به روش‌هایی دست یافته‌اند که به کمک علم نوپای بیوآنفورماتیک می‌توان روش‌هایی بسیار دقیق‌تر، اختصاصی‌تر و سریع‌تر از تکنیک‌های متداول مولکولی که بسیار گران قیمت و نیاز به متخصصین مجرب نیز دارد در علوم تشخیصی ارایه نمود (۱۳و۹،۸). یکی از روش‌هایی که امروزه توسط محققین بسیار مورد توجه قرار گرفته است روش‌های ایزوترمال است در این روش بدون نیاز به اعمال تناوب دمایی تکثیر DNA امکان پذیر می‌گردد. یکی از این تکنیک‌ها RCAمی‌باشد که به‌دلیل اختصاصیت فوق العاده بالا آن بسیار مورد توجه است؛ لذا از یک پروب بسته برای شناسایی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

منطقه‌ی خاصی از ژنوم موجود مورد استفاده قرار می‌گیرد و چون یک قالب بسته در اتصال به DNA هدف ایجاد می‌کند امکان تکثیر توالی غیر اختصاصی را نزدیک به صفر می‌سازد (۱۷-۱۴،۱۱). در این پروژه به بررسی تکنیک مولکولی RCA که به تازگی توسط محققین جهت رفع نواقص ذکر شده برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز ارایه شده پرداخته می‌شود. با انتخاب دو گونه از جنس کلادوفیالوفورا که هردو از لحاظ فنوتیپی بسیار مشابه هم بوده، از نظر فیلوژنی و تاکسونومی بسیار نزدیک به هم طبقه‌بندی گردیده استفاده شده است.

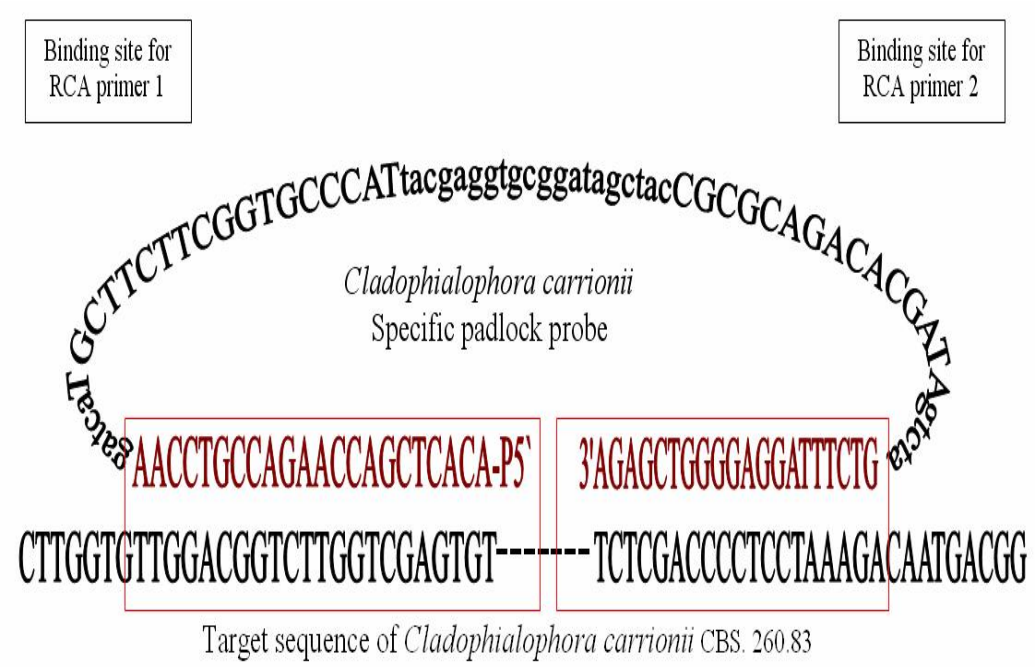
روش بررسی

این تحقیق به صورت کاربردی می‌باشد و پژوهش انجام گرفته به صورت **بررسی تست** است. ابتدا اطلاعات ژنی منطقه‌ی ITS که از جمله ژن‌های DNA ریبوزومی است را برای تمام گونه‌های شناخته شده کلادوفیالوفورا از سایت http://www.ncbi.nlm.nih.gov که یکی از پایگاه‌های اطلاعات ژنی و قابل استناد می‌باشد، جمع‌آوری و با فرمت FASTA بارگذاری گردید و پس از جمع‌آوری اطلاعات توسط نرم‌افزار CLUSTALX2 کلیه‌ی سکانس‌های نوکلئوتیدی منطقه‌ی ITS rDNA ترازبندی گردید و به‌ترتیب توالی‌های تراز بندی شده توسط نرم افزار نقطه به نقطه بررسی و مناسب‌ترین توالی که بیشترین تفاوت را در جایگاه‌های مشابه سایر گونه‌ها دار بود تفکیک و یادداشت گردید (جدول ۱) (۲۰-۱۸و۱۳). این مرحله حساس‌ترین مرحله‌ی تکنیک RCA می‌باشد چراکه در این مرحله با بررسی دقیق تفاوت درتوالی نوکلئوتیدی بهترین ناحیه‌ی ژن از لحاظ تساوی موقعیتی با بالاترین تفاوت انتخاب می‌گردد.

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی ناحیه‌ی ITS1 از DNA ریبوزومی و پروب طراحی شده برای گونه‌های قارچی کاریونی و یگرزی

قارچ کلادوفیالوفورا کاریونی
5'TTGGACGGTCTTGGTCCAGTGT TCTCGACCCCTCCTAAAGAC3'
5'PACACTCGACCAAGACCGTCCAA*gatcatgcttcttcggtgcccattacgaggtgcggatagctaccgcgcagacacgatagtcta*GTCTTTAGGAGGGGTCGAGA3'
قارچ کلادوفیالوفورا یگرزی
5'GGACCCGTCTCACGACCGCCCGTGGGATCGCCGTGAGGCGTC3'
5'PCGGGCGGTCGTGAGACGGGTCC*gatcatgcttcttcggtgcccattacgaggtgcggatagctaccgcgcagacacgatagtcta*GACGCCTCACGGCGATCCCA3'

پس از تعیین توالی هدف اقدام به تهیه‌ی پروب بسته گردید در این مرحله توالی مکمل رشته‌ی هدف باز چینی شد و از منطقه‌ای که تفاوت نوکلئوتیدی حتی در یک نوکلئوتید وجود داشت یک شکست فرضی ایجاد می‌گردد و مطابق شکل (۱) یک لینکر ثابت به دو انتهای $3'$ و $5'$ توالی مکمل متصل می‌شود. لینکر دارای توالی است که محل اتصال پرایمرهای RCA1 و RCA2 می‌باشد (شکل ۱). پس از تکمیل طراحی پروب (جدول ۱) توالی‌ها به‌دست آمده به‌وسیله‌ی یکی از شرکت‌های به‌صورت مصنوعی تهیه گردید.



شکل ۱: تصویر شماتیک از پروب طراحی شده برای کلادوفیالوفورا کاریونی به شماره‌ی کد CBS 260.83.

کشت و استخراج DNA: برای بررسی تکنیک RCA ابتدا دو گونه‌ی کلادو فیالوفورا کاریونی به شماره‌ی کلکسیون CBS 260.83 و کلادوفیالوفورا یگرزی به شماره‌ی کلکسیون CBS 114405 به صورت لیوفریزه از مرکز CBS تهیه، پس از ریکاوری در محیط کشت پتیتودکستروزبراث تلقیح سپس توسط کیت تجاری Mobio ((Mobio, Carlsbad,CA 92010, USA) عملیات استخراج DNA انجام گرفت و توسط تکنیک اسپکتروفتومتری خلوص DNA ارزیابی شد.

تکثیر DNA با استفاده از روش PCR: در تکثیر PCR از دو پرایمر ITS1 و ITS4 مناطق اختصاصی کلادوفیالوفورا استفاده گردید و مطابق جدول ۲ محلول واکنش با ۲ میکرولیتر از DNA نمونه در حجم ۵۰ میکرولیتر آماده گردید سپس مطابق سیکل دمایی موجود در جدول ۳ شرایط دمایی بهینه توسط دستگاه ترمال سایکلر ساخت Actec مدل PC818 برنامه ریزی و اجرا گردید.

جدول ۲: مقادیر لازم برای واکنش ۵۰ میکرولیتری PCR

نمونه	مواد
۵ µl	PCR buffer
۲،۵ µl	$MgCl_2$
۱ µl	Primer ITS1
۱ µl	Primer ITS2
۲،۵ µl	dNTP Mix
۱ µl	Taq Polymerase
۳۵	dH_2o
۴۸ µl	Total volume

برای بررسی محصول PCR مقدار ۸ میکرولیتر از محصولات PCR را با ۲ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری کاملا مخلوط کرده، سپس با دقت به هریک از چاهک‌های ژل که در محلول TBE غوطه‌ور بود، ریخته شد. در این قسمت اولین چاهک را مخصوص مارکر DNA و آخرین چاهک را برای کنترل

منفی قرار دادیم. تانک الکترفورز را به منبع جریان برق وصل کردیم از آنجایی که DNA بار منفی دارد و به طرف قطب مثبت حرکت می‌کند، بخش چاهکی در طرف قطب منفی قرارداده شد. الکتروفورز در ولتاژ ۱۰۰ به مدت یک ساعت انجام شد. سپس ژل از قالب برداشته شد و در داخل دستگاه Gel Documentation گذاشته، پس از تنظیم دستگاه عکس ژل مورد نظر گرفته شده، بدینوسیله نتیجه‌ی حاصل از PCR ثبت شد.

جدول ۳: برنامه‌ی مراحل مختلف PCR

نام مراحل	مراحل	تعداد چرخه	دما	زمان
Pre Heat	۱	۱ سیکل	۹۵°C	۲ دقیقه
Denaturation	۲	۳۵ سیکل	۹۴°C	۴۵ ثانیه
Annealing	۳		۵۲°C	۱:۳۰ ثانیه
Extension	۴		۷۲°C	۳۰ ثانیه
Final Extension	۵	۱ سیکل	۷۲°C	۷ دقیقه

تکثیر DNA با استفاده از روش RCA: واکنش RCA در چهار مرحله انجام می‌گیرد، الف: مرحله‌ی هیبریدیزیشن که در این مرحله دو قسمت از توالی مکمل به DNAی هدف متصل می‌گردد. ب: مرحله‌ی اتصال، در این مرحله آنزیم DNA لیگاز با برداشت فسفات از انتهای ´5 آن را به انتهای ´3 متصل می‌کند. در این صورت یک پروب بسته با یک توالی مکمل هدف به شکل حلقه ایجاد می‌گردد. پ: مرحله‌ی تکثیر، در این مرحله نیز با استفاده از آنزیم Bst DNA پلیمراز با اتصال پرایمر RCA1 به جایگاه خود بر روی پروب اولین رشته‌ی مکمل از پروب به‌دست می‌آید، سپس پرایمر RCA2 به جایگاه خود بر روی محصول متصل می‌گردد و عمل تکثیر توسط آنزیم ادامه می‌یابد، این واکنش‌ها به‌طور متوالی و پشت سرهم ادامه پیدا کرده تا یک ساختار گل کلم مانند ایجاد شود. ج: مرحله‌ی ظاهر سازی، از طریق کروماتوگرافی ژل الکتروفورز به بررسی باندهای ایجاد شده بر روی ژل پرداخته می‌شود که حضور باندهای نردبانی متوالی در هر واکنش RCA برای گونه‌های کلادوفیالوفورا تایید گردید.

جدول ۴: مقادیر لازم برای ۱۰ میکرولیتر واکنش ***Ligation***

مواد Ligation Mix	غلظت اولیه	نمونه
Ligation Buffer(10X)	۱۶	۱ µl
Padlock Probe	۱۶	۱ µl
Ligase	۸	۰/۵ µl
Template	۱۶	۱ µl
dH2O (آب دیونیزه)	۱۰۴	۶/۵ µl
Total volume		۱۰ µl

جدول ۶: برنامه‌ی دمایی مرحله‌ی *Ligation*

نام مراحل	مراحل	تعداد چرخه	دما	زمان
Pre Heat	۱	۱ سیکل	۹۵°C	۵ دقیقه
Denaturation	۲		۹۴°C	۳۰ ثانیه
Ligation	۳		۶۲°C	۴ دقیقه

جدول ۷: مقادیر لازم برای ۲۰ میکرولیتر واکنش *RCA*

مواد	غلظت اولیه	نمونه
Buffer	۴۰ µl	۲/۵ µl
RCA1 (10 pmol)	۱۶ µl	۱ µl
RCA2(10 pmol)	۱۶ µl	۱ µl
dNTP Mix (5mM)	۱۶ µl	۱ µl
Bst DNA Polymerase	۸ µl	۰/۵ µl
dH2O (آب دیونیزه)	۱۹۲ µl	۱۲
Total volume	۱۸µl به اضافه ۲ µl محصول Ligation	

جدول ۸: برنامه‌ی دمایی مرحله‌ی *Amplification*

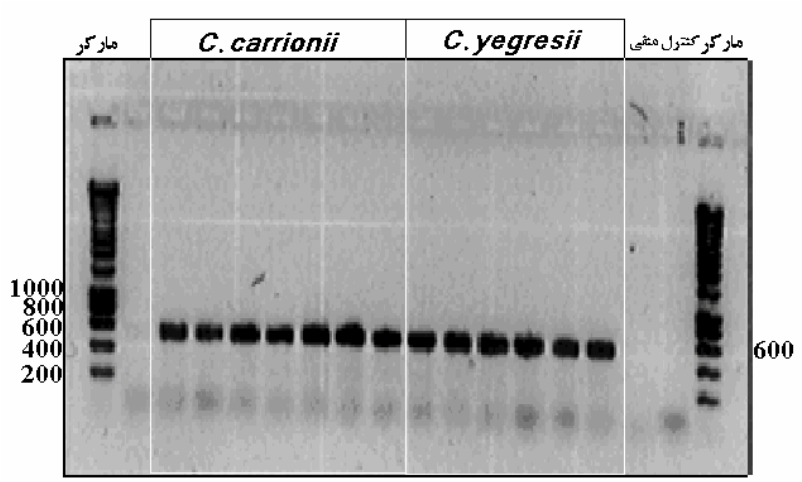
نام مراحل	مراحل	تعداد چرخه	دما	زمان
Amplification	۱	۱ سیکل	۶۵°C	۶۰ دقیقه
Final Extension	۲		۸۵°C	۲ دقیقه
Hold	۳		۴°C	Hold

مراحل اجرای کار در دو بخش اتصال با افزودن ترکیبات طبق جدول ۴ در شرایط دمایی موجود در جدول ۶ و سپس مرحله‌ی تکثیر طبق شرایط موجود در جداول ۷ و ۸ با افزودن ترکیبات واعمال شرایط دمایی مذکور انجام گردید. نتایج با الکتروفور محصول RCA با ترکیب ۸ میکرولیتر از محصولات RCA و ۲ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری در هر یک از چاهک‌های ژل الکتروفورز انجام گردید.

یافته‌ها

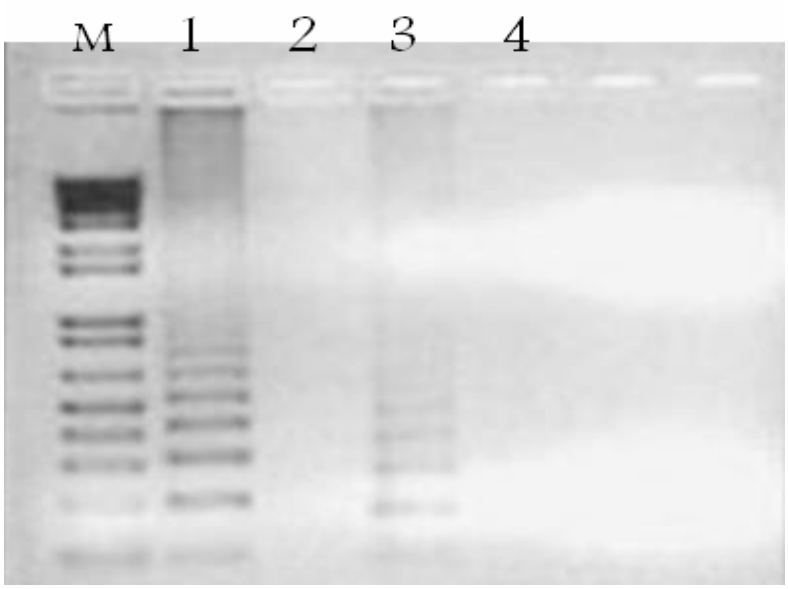
با توجه به اینکه منطقه‌ی ژنی ITSrDNA در هر دو قارچ مورد مطالعه دارای اندازه‌ی تقریبا ۶۰۰ bp می‌باشد، انتظار می‌رفت پس از طی مراحل PCR و نهایتا با بررسی و الکتروفورز محصول PCR با توجه به مارکر مقابل باند ۶۰۰bpی از مارکر متوقف گردد. در بررسی نتایج به‌دست آمده از مرحله‌ی PCR ملاحظه‌ی باندهای ۶۰۰ bp حاصل از تکثیر ناحیه‌ی ITS هر دو گونه *C. carrionii* و *C. yegresii*

مورد تایید قرار گرفت. در این بررسی با توجه به‌اینکه کل منطقه‌ی ITS rDNA آمپلی‌فای می‌گردد، امکان بررسی در حد گونه وجود ندارد (شکل ۲).



شکل ۲: نتیجه‌ی واکنش PCR برای قارچ کلادوفیالوفورا کاریونی و کلادوفیالوفورا یگرزی

در بررسی نتایج حاصل از واکنش RCA با توجه به شکل۳ حضور باندهای نردبانی حاصل از تکثیر تو در تو و گل‌کلمی واکنش RCA دلالت بر انجام واکنش دارد و این در صورتی است که با توجه به طراحی پروب اختصاصی که به تفصیل اشاره شد هیچ واکنش متقاطع و با غیر اختصاصی طبق پیش‌بینی انجام شده صورت نگرفت و به‌صورت کاملا اختصاصی تکثیر انجام گردید. این تکنیک جهت بهینه‌سازی واکنش با بررسی دماهای واکنش میزان ترکیبات و آنزیم‌های به‌کار برده شده و زمان اعمال شده برای واکنش اپتی‌مایز گردید. با توجه به عدم امکان تکثیر در حضور گونه‌های دیگر از کلادوفیالوفورا، واکنش کاملا اختصاصی و امکان تشخیص در حد گونه را فراهم می‌نماید.



شکل ۳: نتیجه‌ی واکنش RCA، M مارکر، ۱) کلادوفیالوفورا کاریونی، ۲) کنترل منفی، ۳)کلادوفیالوفورا یگرزی، ۴) کنترل منفی

بحث

پاتوژن‌های قارچی عوامل عفونی تهدیدکننده‌ی زندگی برای بیماران بدحال و دارای نقص سیستم ایمنی هستند که در برخی موارد شناخت سریع آن عوامل در حد گونه بسیار ضروری است. روش‌های متداول تشخیصی بخصوص برای قارچ‌های شبه مخمری سیاه بسیار وقت گیر و باتوجه به این که شرایط اسپورزایی بسیار متنوعی دارند، امکان تشخیص گونه از طریق بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی (کشت) دشوار است و همینطور روش‌های مولکولی متداول مانند PCR نیز با وجود نواقص تشخیصی وارد برآن باعث گردید تا محققان جهت رفع مشکلات مطرح شده به بررسی تکنیک‌های مختلف تشخیص از جمله RCA روی‌گردان شوند (۲۱و۱۵،۱۱، ۴، ۳). در نتایج به‌دست آمده از این مطالعه حضور باندهای متواتر و پشت سرهم علاوه براینکه نشان دهنده‌ی عملکرد تکنیک RCA می‌باشد، بیان‌گر تکثیر اختصاصی منطقه‌ی ITS1 در هر کدام از گونه‌های ذکر شده می‌باشد. در روش RCA مولکولی برای تشخیص قارچ‌های پاتوژن از جمله کلادوفیالوفورا کاریونی مناطق حایز اهمیت همان منطقه‌ی DNA ریبوزومی ITS1 و ITS2 می‌باشد که یک منطقه‌ی متغیر برای گونه‌های مختلف قارچی می‌باشد که در تکنیک PCR نیز اکثراً از این منطقه برای تشخیص استفاده می‌شود (۱۳). این روش با ایجاد یک غالب مکملی برای DNA هدف با اتصال اختصاصی و با استفاده از آنزیم DNA *Bst* پلیمراز که محصول مهندسی ژنتیک جهت تکثیردر شرایط ایزوترمال می‌باشد، مزیت‌هایی را برای این تکنیک ایجاد کرده است که باعث افزایش اختصاصیت و همچنین صرف وقت و مواد کمتر شده است (۲۲). با توجه به این که طراحی پروب و پرایمر نیاز به دسترسی به پایگاه‌های اطلاعات ژنی دارد با بررسی مناطق اختصاصی ITS کلیه‌ی گونه‌های کلادوفیالوفورا می‌توان ناحیه‌ی متغیر گونه‌های مذکور را به‌دست آورد و با داشتن یک پروب بسته اختصاصی و دو آغازگر، تهیه‌ی آن را میسر گرداند که همین مهم دلیلی بر انعطاف‌پذیری این روش می‌باشد (۲۲،۱۳،۱۱). کل واکنش تکثیر تحت شرایط تک دمایی به شکل پیوسته انجام می‌پذیرد در نتیجه نیاز به دستگاه گران قیمت ترمال سایکلر ندارد و مقرون به صرفه است و همچنین زمانی جهت تغییر دما از دست نمی‌رود و واکنش فقط نیاز به یک سیکل و دمای بهینه فعالیت آنزیم دارد (۲۳و۱۱). طبق گزارش ارایه شده توسط لوئیتز و همکاران امکان استفاده از تکنیک RCA در بررسی Microarrays و تکثیر سیگنالینگ DNA، RNA و پروتئین در مقایسه با سایر روش‌های ایزوترمال به‌عنوان یک مزیت منحصر به فرد است (۲۶-۲۴، ۱۵). ریمار و همکاران در بررسی که توسط تکنیک RCA برای تشخیص DNA ویروسی داشته با بیان اینکه در روش RCA نیاز به پرایمر اختصاصی نیست، توانسته ۱۳ واریته ناشناخته از پاپیلوما ویروس را شناسایی کنند و اساسا مهم‌ترین عملکرد RCA را در همین موضوع بیان نموده است (۲۹-۲۷، ۲۲). با ایجاد یک قالب، خواندن و تکثیر آن توسط آنزیم ایزوترمال نه تنها محصول غیر اختصاصی تولید نمی‌کند، بلکه با تکثیراختصاصی غالب به‌شکلی بسته از تولید محصول غیر اختصاصی جلوگیری می‌کند (۳۰). با توجه به آسان بودن عملیات آزمایش RCA می‌توان به‌صورت سیار و در هر محلی این آزمایش را انجام داد و نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی خاص ندارد و با یک بنماری ساده نیز می‌توان این تست را عملی نمود. برای تمام گونه‌ها و موجودات کاربرد دارد و گونه‌های وابسته به‌هم می‌توانند از طریق RCA بسیار دقیق‌تر از PCR شناسایی و تفکیک شوند، زیرا این تکنیک با تفاوت یک باز نوکلئوتید هم امکان تشخیص و تکثیر اختصاصی را دارد. پروب‌های ساخته شده می‌تواند هم برای DNA و هم برای RNA استفاده شود. در آزمایش RCA تشخیص می‌تواند با تعداد اندک DNA نیز شروع شود و حتی قادر است DNAیی را که کمتر از $۱۰^{۳}$ کپی از آن

موجود است را شناسایی نمایـد (۳۲و۲۶، ۲۵، ۱۵). کـارایی و علکرد این تکنیک برای اولین بـار در کـشورمان ایـران مـورد بررسی قرارگرفته و بهینه سازی شده است. در ایـن مطالعـه از دو گونه‌ای که از لحاظ فیلـوژنیکی بـسیار مـشابه هـم بودنـد جهت بررسی اختصاصیت روش RCA استفاده گردید (۷و۶). محصولات واکـنش مخلـوطی از رشـته‌هـای اصـلی DNA و مکمل آن با ساختاری شبیه گل کلم با حلقـه‌هـای متعـدد کـه اتصالاتی با توالی‌های معکوس تکراری با توالی هـدف تکثیـر شده را ایجاد می‌نمایند (۱۳).

نتیجه‌گیری

بـا توجـه بـه نتـایج حاصـل از ایـن مطالعـه، تکنیـک RCA در مقایسه با روش‌های روتـین موجـود (بررسـی‌هـای میکروسـکوپی، ماکروسـکوپی و مولکـولی) بـرای تـشخیص آلودگی‌های قارچی در حدگونه و اختصاصیتی حتـی بـا یـک نوکلئوتید تفاوت، سریع بودن، ارزان بودن و نسبتا با حساسیت بالا روش مناسبی می‌باشد. لـذا پیـشنهاد مـی‌گـردد از تکنیـک RCA به‌عنوان یک روش کـاربردی و آسـان بـا اختـصاصیت منحصر به فرد در آزمایشگاه‌های تشخیصی با کمترین امکانات ممکن استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهـشی و همکـاران آزمایشگاه تحقیقات مرکـزی دانـشگاه علـوم پزشـکی زنجـان جهت حمایت و پشتیبانی ایشان در اجرای این مطالعه نهایـت تقدیر و تشکر را دارد.

References

1- Amanloo S. Review of fungal diseases in medicine. Aghil: Tehran, Iran; 2008.

2- Khosravi AR. Medical Mycology, practical methods. Tehran University: Jihad unit press; 2003.

3- Ridely MF. The natural habitat of *Cladosporium carrionii*, a cause of chromoblastomycoosis in man queensland institute of medical research. *Aust J Dermatol*. 1957; 4: 23-7.

4- Martinez RL, Tovar LJ. Chromoblastomycosis. *J clin dermatol.* 2007; 25: 188-94.

5- Emami M, Mogademi M. The first report of chromoblastomycosis in Iran: Paper presented at Second International Congress of Tropical Medicine and Malaria. Amesterdam, Holand. 1988.

6- Hoog GSde, Nishikaku AS, Zeppenfeldt GF, et al. Molecular Analysis and pathogenicity of the *cladophialophora carrionii* complex with the description of a novel species. *Stud Mycol.* 2007; 58: 219-34.

7- Badali1 H, Gueidan C, Najafzadeh MJ, Bonifaz A, Gerrits AHG, Hoog GS. Biodiversity of the genus *cladophialophora*. *Stud Mycol.* 2008; 61: 175-91.

8- Brown TA. Genomes 3. Carland science: New York. 2007.

9- Brown TA. Gene cloning and analysis an introduction. UK: Wiley- Black well; 2010.

10- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12): e63.

11- Moradi A, Karami A, Hagh Nazari A, Ahmadi Z, Soroori Zanjani R, Javadi SM. Comparison of

the PCR and LAMP techniques in the diagnosis of salmonella infection. *J Zanjan Uni Med Sci.* 2008; 17: 66-77.

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

13- Zhou X, Kong F, Sorrell TC, Wang H, Duan Y, Chen SCA. Practical method for detection and identification of candida, aspergillus, and scedosporium spp. by use of rolling-circle amplification. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2423-7.

14- Yoshida A, Nagashima S, Ansai T, et al. Loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the periodontopathic bacteria *porphyromonas gingivalis*, tannerella forsythia, and *treponema denticola*, J Clin Microbiol. 2005; 43: 2418-24.

15- Schweitzer B, Kingsmore S, Combining nucleic acid amplification and detection. *Analytical Biotechnol.* 2001; 12: 21-7.

16- Mary c. Edvaed & reachard E. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Res.* 1994; 30: s65-s75.

17- Gusev Y, Sparkowski J, Raghunathan A, et al. A new approach to increase sensitivity for immunohistochemistry and flow cytometry. *Am J Pathol.* 2001; 159: 63-69.

18- Howard Hughes Medical Institute, under grants R01-HG00257 and P50-HG00098 primer design. 2000. Avalable from: http://frodo. wi.mit. edu/primer3.

19- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W, Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 2007. Avaiable from: http://simgene.com/ ClustalW.

20- National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine. 1993. Avaiable from: http://www.ncbi.nlm. nih. gov

21- Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *Expert Rev Mol Diagn.* 2004; 5: 795-800.

22- Reimar J, Hermann l, Annabel R, Marc van R, Hans S. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol.* 2009; 29: 205-11.

23- Wang B, Potter SJ, Lin Y, et al. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(5): 2339-44.

24- Nallur G, Luo C, FangL, et al. Signal amplification by rolling circle amplification on DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: e118-e126.

25- Schubert J, Habeku A, Kazmaier K, Jeske H. Surveying cereal-infecting geminiviruses in germany-diagnostics and direct sequencing using rolling circle amplification. *Virus Res.* 2007; 127: 61-70.

26- Christian AT, Pattee MS, Attix CM, Reed BE, Sorensen KJ, Tucker JD. Detection of DNA point mutations and mRNA expression levels by rolling circle amplification in individual cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 14238-43.

27- Ogawa T, Tomita Y, Okada M, Shirasawa H. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J Gen Virol.* 2007. 88, 1934-8.

28- Yam WC, Chan KH, Poon LLM, et al. Evaluation of reverse transcription-PCR assays for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome associated with a novel coronavirus. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4521-4.

29- Stevens H, Rector A, Bertelsen MF, Leifsson PS, Ranst MV. Novel papillomavirus isolated from the oral mucosa of a polar bear does not cluster with other papillomaviruses of carnivores. *Vet Microbiol.* 2008. 129, 108-16.

30- Nilsson M. Lock and roll: Single-molecule genotyping in situ using padlock probes and rolling circle amplification. *Histochem Cell Biol*. 2006; 126: 159-64.

31- Wharam SD, Marsh P, Lloyd JS, et al. Specific detection of DNA and RNA targets using a novel isothermal nucleicacid amplification assay based on the formation of a three-way junction structure. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: e54.

33- Moore P. Replicating success rolling circle amplificationon plasmid glycerol stock. *Nature.* 2005; 435: 235-8.

The Use of Rolling Circle Amplification for Molecular Identification of Cladophialophora carrionii and Cladophialophora yegresii

Hamzehei H[1], Badali H[1], Rahnema M[1], Ajalli M[1]

[1]Dept. of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

Corresponding Authors: Badali H, Dept. of Microbiology, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran

E-mail: badalii@yahoo.com

Received: 13 Nov 2011 **Accepted:** 7 Apr 2012

Background and Objective: Epidemiological studies indicate that not only the incidence of fungal infections is dramatically on the rise, especially in the immunocompromised hosts, but also the sensitivity of etiological agents to antifungal drugs shows a remarkable reduction. Therefore, early detection at the species level is critically important for proper clinical management. Because standard diagnostic procedures are time consuming, expensive, and less sensitive, PCR-based molecular techniques have been developed. In the present study, we aim to describe a rapid and sensitive technique based on the rolling circle PCR amplification for accurate and fast identification of *Cladophialophora carrionii* vs. *C. yegresii*.

Materials and Methods: Specific padlock probes were designed based on a single nucleotide polymorphism (SNP) difference in the internal transcribed spacer (ITS) rDNA region of *Cladophialophora* strains to differentiate between *C. carrionii* and *C. yegresii*. The probe sequences are complementary to the target DNA leading to the linker position that after hybridization with the target DNA will be joined together by DNA ligase, form a closed molecule and hybridize to the target DNA for replication at single-temperature conditions.

Results: We successfully amplified the target fungi DNA at the species level without any false and negative cross reactivity. The RCA product was visualized on 1.5% agarose gel to clarify the specificity of the probe–DNA template binding.

Conclusion: These results demonstrate that RCA is a powerful and accurate tool for discrimination and identification of pathogenic fungi.

Keywords: Rolling circle amplification, DNA, Cladophialophora carrionii, Cladophialophora yegresii, Chromoblastomycosis