

۱-حسن علی کاهی (M.Sc)، گروه قارچ شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، piroozomidvar@gmail.com

۲-رضا کچوئی (PH.D)، گروه میکروپ شناسی، دانشگاه بقیه الله، kachueir@gmail.com

۳-دکتر محمد حسین یادگاری، دانشیار، دانشگاه تربیت مدرس تهران، دانشکده علوم پزشکی، گروه قارچ شناسی yadegarm@modares.ac.ir

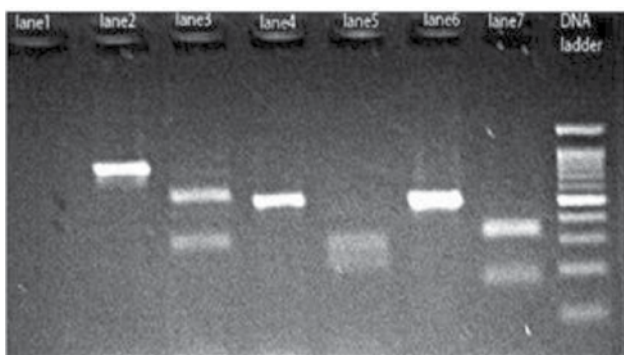
معرفی آنزیم *Cac8* برای افتراق گونه های کاندیدا

زمینه و هدف: آنزیم *MspI* از دیرباز در تکنیک PCR-RFLP برای افتراق گونه های کاندیدا استفاده شده است، ولیکن کاستی های گوناگونی داشته است. بدین روی گزینش جایگزین برای آن در تشخیص گونه ها اهمیت دارد. روش بررسی: در این بررسی توسط نرم افزار (MEGA X 10 (2018 در محدوده ژنی ITS با استفاده از پرایمرهای یونیورسال، توالی قطعات مربوط به ITS1-ITS4 در ۲۰۰ گونه مختلف کاندیدا دسته بندی شدند. سپس این توالی ها به وب سایت NEBCutter انتقال یافتند و برای انتخاب بهترین آنزیم جهت تفکیک گونه ها مورد بررسی قرار گرفتند. یافته ها: از بین آنزیم های وب سایت NEBCutter، تعدادی آنزیم شناسایی شدند که قابلیت تفکیک نسبتا مناسبی برای افتراق گونه های کاندیدا دارند. نتیجه گیری: آنزیم *Cac8* نسبت به سایر آنزیم های شرکت BioLabs New England از جمله *MspI* و همچنین آنزیم های دیگر تجاری موجود برای تفکیک گونه های کاندیدا ارجحیت دارد.

پیشگفتار

تشخیص قطعی گونه های مختلف کاندیدا، متکی به تکنیک های ملکولی از جمله PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) است. در مورد جنس کاندیدا می توان توسط آنالیز ژن محافظت شده ی ITS (Internal Transcribed Spacer) به تشخیص دقیق گونه ها دست یافت [۱]. انتخاب آنزیم مناسب برای RFLP برای بدست آوردن الگوهای خاص باندهای DNA در الکتروفورز اهمیت ویژه ای دارد. هر آنزیم دارای جایگاه اثر خاص خود است و از این رو چون محل برش آنزیم ها روی توالی ژنی متفاوت هست الگوی نتایج هضم آنزیمی نیز متفاوت خواهد بود. یا این که آنزیم *MspI* به گونه ی روزمره برای افتراق گونه های کاندیدا به کار رفته است، اما هم چنان که در الگویی از نتایج PCR-RFLP در شکل ۱ دیده می شود، این آنزیم بعضی از گونه ها را نمی تواند تفکیک و شناسایی کند

(از جمله گونه های کاندیدا پاراپسیلوزیس، کاندیدا کفیر، کاندیدا فاماتا که از گونه های شایع جنس کاندیدا هستند) [۲]. از این رو آنزیم مناسب تر که دارای قدرت تمایز بیشتری بین گونه ها ست مورد جستجو قرار گرفت.

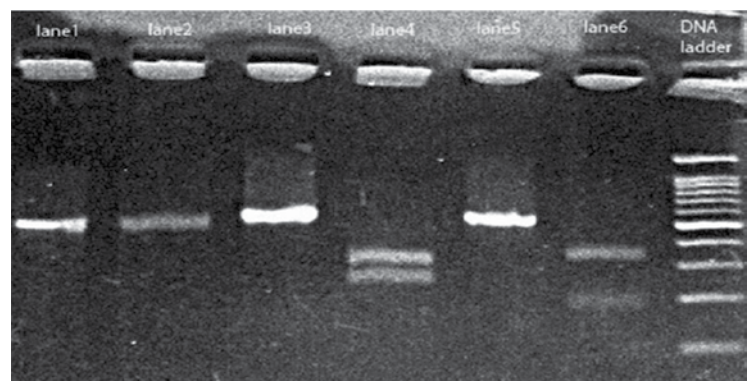


شکل ۱. الگوهای مختلف حاصل از برش آنزیمی محصولات PCR ژن ITS r DNA در شش ایزوله کاندیدا با استفاده از آنزیم *MspI*.
۳: کاندیدا گلابراتا، ۵: کاندیدا آلبیکنس، ۷: کاندیدا اتروپیکالیس.
۶ و ۸: گونه نامشخص، اولین ردیف از سمت راست: مارکر DNA

روش بررسی

در این بررسی با استفاده از نرم افزار (MEGA X 10 (2018 molecular evolutionary genetics analysis) به بانک ژنی گونه های *Candida* دسترسی پیدا کرده و به این وسیله لیست توالی های شامل ژن ITS1-ITS4 (تمام گونه ها تهیه شد. پردازش های آنژیومی روی توالی ها در وب سایت NEBCut- انجام گرفت تا مناطق هضم آنژیومی توسط آنژیوم های مختلف مشخص شود. سپس در خصوص هر گونه با مقایسه طول قطعات حاصل از برش های آنژیومی، مشخص شد که کدام آنژیوم باندهای با الگوی متمایز در الکتروفورز به وجود می آورد.

در وب سایت NEBcutter متجاوز از ۲۰۰ آنژیوم برای انتخاب جهت هضم آنژیومی و به دست آوردن الگوی مناسب جهت افتراق ورینت های مختلف ژن ها وجود دارد. آنژیومی جهت PCR-RFLP مناسب است که محصول PCR همه گونه ها را بتواند هضم کند و در مورد هر گونه یک الگوی هضم خاص و متفاوت ایجاد کند. شکل ۲ نمونه ای از الگوهای هضم آنژیومی ژن ITS در گونه های *Candida* با استفاده از آنژیوم *MspI* را نمایش می دهد [۲].



شکل ۲) نتایج مربوط به PCR-RFLP با استفاده از آنژیوم *MspI*. به ترتیب شامل ۱: گونه نامشخص (PCR) ۲: گونه نامشخص (RFLP) ۳: *Candida albicans* (PCR) ۴: *Candida albicans* (RFLP) ۵: *Candida tropicalis* (PCR) ۶: *Candida tropicalis* (RFLP) و در سمت راست تصویر، لدر ۱۰۰bp را ملاحظه می نمایید.

نتایج: حدود ۲۰۰ توالی ژن ITS گونه های مختلف *Candida* که در نرم افزار (MEGA X 10 (2018 مرتب شدند، تحت اثر آنژیوم های پایگاه NEBcutter قرار گرفتند. با مقایسه عملکرد آنها نهایتاً این نتیجه حاصل شد که آنژیوم های *Cac8 I*، *BsoFI* و *MboI* برای افتراق گونه های

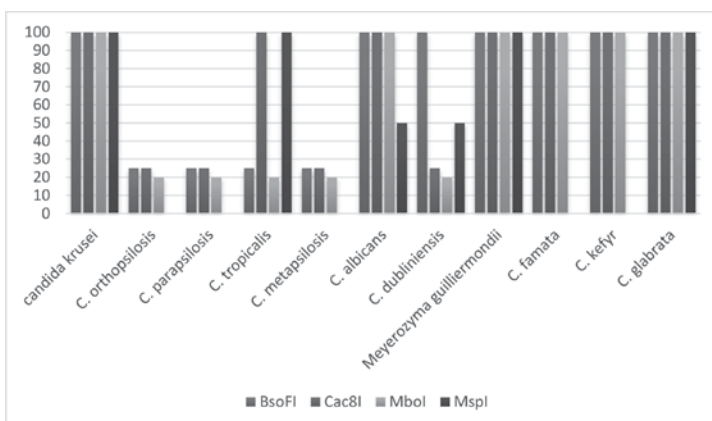
Candida از بقیه آنژیوم ها مناسب ترند. گفتنی است آنژیوم *MspI* که همواره در تحقیقات استفاده شده است [۳]، در خصوص گونه های *C. parapsilosis*، *C. orthopsilosis*، *C. metapsilosis*، *C. famata* و *C. kefyr* هیچ گونه هضمی انجام نمی دهد و لذا قدرت تفکیک و تشخیص این گونه ها را ندارد.

با توجه به محاسبه $p\text{-value} < 0.05$ در آزمون χ^2 توسط نرم افزار Graphpad Prism، نتایج این بررسی از نظر آماری معنی دار می باشد. نتایج به شکل درصد توانایی آنژیوم ها در شناسایی گونه های مختلف در نمودار ۱ منعکس شده است. به عنوان مثال توانایی آنژیوم *Cac8 I* برای تشخیص *Candida* کفیر و *Candida* فاماتا ۱۰۰٪ است. یعنی الگوهای ایجاد می کند که از گونه های دیگر قابل افتراق باشند.

بحث

در پژوهش پیش رو با استفاده از نرم افزار (MEGA X 10 (2018 و وب سایت NEBcutter آنژیوم جدیدی برای افتراق گونه های *Candida* جایگزین شد که استفاده از آن به مراتب برای تشخیص گونه ها بسیار مناسب است. با توجه به بررسی های بیوانفورماتیک و مقایسه الگوهای هضم آنژیومی متمایز، سرانجام این نتیجه به دست آمد که آنژیوم *Cac8 I* برای افتراق گونه های *Candida* مناسب ترین آنژیوم است. به این دلیل که الگوهای خاصی را برای گونه های مختلف از جمله *C. famata* و *C. kefyr* و کمپلکس *parapsilosis* به وجود می آورد که در الکتروفورز به راحتی بتوان ایزوله ها را شناسایی نمود.

حتی می تواند جنس های *Rhodotorula* و *Saccharomyces* را نیز از جنس *Candida* تشخیص و افتراق بدهد.



نمودار ۱. مقایسه درصد قابلیت آنژیوم های مختلف برای تشخیص گونه های *Candida*

منابع:

[1] M. Kordalewska, J. Kalita, Z. Bakula, A. Brillowska-Dąbrowska, and T. Jagielski, "PCR-RFLP assays for species-specific identification of fungi belonging to *Scopulariopsis* and related genera," *Medical Mycology*, vol. 57, no. 5, pp. 643-648, 2019.

[2] A. Jayachandran, R. Katragadda, R. Thyagarajan, K. Leela, K. Shanmugam, and A. Chelliah, "Oropharyngeal candidiasis among HIV seropositive patients in Chennai, South India: An evaluation of Polymerase chain reaction-Restriction Fragment Length polymorphism for speciation and Antifungal drug resistance," *Journal of The Academy of Clinical Microbiologists*, Original Article vol. 19, no. 2, pp. 86-92, July 1, 2017 2017.

[3] R. Mohammadi et al., "Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients," *Medical Mycology*, vol. 51, no. 6, pp. 657-663, 2013.



نتیجه گیری

پیشنهاد می شود از این پس برای افتراق گونه های کاندیدا در تحقیقات در صورت استفاده از ژن ITS از آنزیم *Cac8 I* استفاده شود به علاوه چنان که *Ladder 50 bp* بکار رود و تایم الکتروفورز ۶۰ دقیقه رعایت شود و درصد ژل آگارز برای ۲.۵٪ RFLP باشد که این شرایط باعث می شود قطعاتی که کمتر از ۵۰ bp اختلاف طول دارند راحت تر روی ژل از هم تفکیک شوند.



فرم اشتراک ماهنامه دانش پزشکی ۱۳۹۹

نام و نام خانوادگی: رشته/تخصص: کد ملی:

نام محل کار: مسئولیت:

نشانی:

کدپستی: تلفن: فاکس:

موبایل: ایمیل:

♦ تکمیل تمام موارد فوق الزامی است ♦

اشتراک یکساله (با پست عادی) ۲۶۴۰۰۰ ریال	اشتراک ۶ ماهه (با پست عادی) ۱۳۲۰۰۰۰ ریال
اشتراک یکساله (با پست سفارشی) ۳۰۰۰۰۰۰ ریال	اشتراک ۶ ماهه (با پست سفارشی) ۱۸۰۰۰۰۰ ریال

مبلغ اشتراک یکساله خارج از کشور با پست سفارشی ۳۶۰ دلار است.

لطفاً برای شروع یا تمدید اشتراک، رسید فیش واریزی را همراه با فرم تکمیل شده فوق به شماره زیر فاکس نمایید.

کارت بانک پاسارگاد به شماره کارت ۵۰۲۲-۲۹۱۰-۸۲۸۷-۷۲۲۴ و شماره حساب ۱-۱۲۰۸۴۲۳۴-۸۰۰۰-۲۰۶ به نام آقای محمود اصلانی

ایمیل: matashkhis@gmail.com تلفن: ۰۹۱۳۷۷۳۳۴۰۷-۰۶۶۹۱۰۶۱۶-۸۸۹۸۷۵۰۱ نمابر: ۸۹۷۷۶۷۶۹