ISSN: 2383-3483; Journal of Police Medicine. 2020;9(1):9-16

Journal of Police Medicine

Journal Homepage: http://teb.police.ir/teb/

Original Article **Open Access**

In Silico Design of a Hybrid Structure as Positive Control for Simultaneous Detection of 4 Pathogenic Agents by PCR Method

Simkhah M.[1] MSc, Dehghan Esmatabadi M.J.[1]* PhD, Zeinoddini M.[1] PhD, Pourmahdi N.[1] MSc.

[1] Faculty of Chemistry & Chemical Engineering, Malek Ashtar University of Technology, Iran.

ABSTRACT

How to cite this article
Simkhah M., Dehghan Esmatabadi MJ, Zeinoddini M., Pourmahdi N. *In Silico Design of a Hybrid Structure as Positive Control for Simultaneous Detection of 4 Pathogenic Agents by PCR Method.* J Police Med. 2020;9(1):9-16.

***Correspondence:**
Address: Lavizan, Malek Ashtar University of Technology. Tehran, Iran.
Postal code: 15875-1774
Phone: +989124765135
Fax: +982122962257
Mail: mohammad_dehghan@mut.ac.ir

Article History
Received: 20/10/2019
Accepted: 02/11/2019
ePublished: 05/01/2020

AIMS. Today, one of the most important problems in detection of human pathogens, is lack of positive control. The idea of using hybrid vectors, containing genes of different pathogens, can overcome this limitation. We can design specific primers for each region and use the hybrid vector as positive control sample in PCR. In this research we designed an in silico hybrid vector and relevant primers for detection of Francisella, Variola, Burkholderia and Yersinia.

MATERIALS & METHODS. In this study, fopA, caf1, 16srRNA and HA genes were chosen to be located on the vector, to respectively represent Francisella, Yersinia, Burkholderia and Variolla,. The sequence of these genes were obtained from NCBI in FASTA format and were aligned in BioEdit 7.0.5.3 software for finding conserve region of each gene, then some purposeful changes were applied in the sequence of each gene and the sequences were placed next to each other and the construct was designed. Specific primers were designed for each region using Oligo7, BioEdit, OligoAnalyzer tool as well as NCBI database. Finally, the construct was cloned in PUC57 in SnapGene 3.2.0.1 and PCR was simulated on hybrid vector using designed primers.

FINDINGS. Analysis confirmed that conserved regions for each gene were located on hybrid vector, and simulation of PCR proved the accuracy of designed primers.

CONCLUSION. A genetic simulator hybrid construct with the types of primers required to identify the four factors Francisla, Varivola, Borghuleria and Yersinia has been designed in silico so that such factors could be identified under positive control in emergencies.

KEYWORD: Cloning Vector, Francisella, Variola, Burkholderia, Yersinia.

CITATION LINKS

[1] Gene cloning and DNA analysis … [2] Cloning should be simple: Escherichia coli DH5α-mediated … [3] Reliable detection of Bacillus anthracis, Francisella tularensis and Yersinia … [4] Rapid field detection assays for Bacillus anthracis, Brucella spp … [5] Detection of Francisella tularensis in ulcers of patients … [6] Anthrax as a biological weapon: medical and public health management … [7] Rapid molecular testing for bioterrorism agents … [8] Design and engineering of a multi-target [multiplex] DNA … [9] Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes … [10] Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management … [11] Melioidosis and glanders as possible biological weapons … [12] Phylogenetic analysis of Burkholderia species by multilocus sequence analysis … [13] Detection of a novel subspecies of Francisella noatunensis as Endosymbiont … [14] Smallpox, [Internet]. Wikipedia … [15] Sherris medical microbiology: an introduction … [16] Development of a real-time PCR assay for detection … [17] A rapid, highly sensitive method for the detection of Francisella … [18] Novel pan-genomic analysis approach in target selection … [19] Detection and differentiation of Burkholderia pseudomallei … [20] Simple and rapid detection of yersinia pestis and francisella … [21] PCR strategy for identification and differentiation of small pox … [22] Database resources of the national center … [23] BioEdit: an important software … [24] Multi-pathogens sequence containing plasmids … [25] Non-infectious plasmid engineered to simulate … [26] Artificial plasmid engineered to simulate … [27] Artificial chimeras engineered to … [28] Method for simultaneously detecting multiple … [29] Simple and Rapid Detection of Yersinia pestis and Francisella … [30] A case report of human tularemia from Iran … [31] Molecular survey of tularemia and plague in small mammals.

طراحی بیوانفورماتیکی یک سازه هیبریدی به عنوان کنترل مثبت جهت شناسایی هم‌زمان چهارعامل بیماری‌زا به روش PCR

مونا سیم خواه[۱] MSc، محمدجواد دهقان عصمت آبادی[۱*] PhD، مهدی زین الدینی[۱] PhD ، نفیسه پورمهدی[۱] MSc

[۱] مجتمع دانشگاهی شیمی و مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، ایران

چکیده

اهداف: امروزه یکی از مهم‌ترین مشکلات در تشخیص پاتوژن‌های انسانی، کمبود کنترل مثبت است. ایدهٔ استفاده از حامل‌های هیبریدی شامل ژن‌های پاتوژن‌های مختلف، می‌تواند به این محدودیت‌ها غلبه کند. ما می‌توانیم برای هر ناحیه پرایمرهای اختصاصی طراحی و از حامل‌های هیبریدی به عنوان نمونهٔ کنترل مثبت در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده کنیم. در این پروژه، ما یک حامل هیبرید و پرایمرهای مربوطه را برای تشخیص فرانسیسلا، واریولا، بورخولدریا و یرسینیا به‌صورت انفورماتیکی طراحی کردیم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ژن‌های fopA، caf1، 16srRNA و HA به ترتیب به نمایندگی از فرانسیسلا، یرسینیا، بورخولدریا و واریولا برای قراردادن روی حامل انتخاب شدند. توالی این ژن‌ها از پایگاه دادهٔ NCBI به فرمت FASTA استخراج شد و برای یافتن ناحیهٔ حفاظت‌شدهٔ هر ژن، در نرم‌افزار BioEdit 7.0.5.3 هم‌ردیف‌سازی شد. سپس تغییرات خاصی در هر منطقه ژنی اعمال گردید و توالی‌ها در کنار یکدیگر قرار گرفتند و سازه مدنظر طراحی شد. پرایمرهای اختصاصی برای هر ناحیه‌ی ژنی با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo 7، BioEdit و همچنین ابزار OligoAnalyzer و پایگاه‌دادهٔ NCBI طراحی شد. در پایان در نرم‌افزار SnapGene 3.2.0.1، سازه در حامل PUC57 همسانه‌سازی شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی حامل هیبریدی با استفاده از پرایمرهای طراحی‌شده، شبیه‌سازی گردید.

یافته‌ها: آنالیزها تأیید کردند که نواحی حفاظت‌شده برای هر ژن روی حامل هیبریدی قرار گرفتند و شبیه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، صحت پرایمرهای طراحی‌شده را تأیید کرد.

نتیجه‌گیری: یک سازه هیبریدی شبیه‌ساز ژنتیکی به همراه انواع پرایمرهای مورد نیاز برای شناسایی چهار عامل فرانسیسلا، واریولا، بورخولدریا و یرسینیا به‌صورت بیوانفورماتیکی طراحی شده است تا بتوان با استفاده از آن به عنوان کنترل مثبت، در شرایط اضطراری بتوانیم این‌گونه عوامل را شناسایی کنیم.

کلیدواژه‌ها: حامل همسانه‌سازی، فرانسیسلا، واریولا، بورخولدریا، یرسینیا

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۷/۲۸
تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۸/۱۱
تاریخ انتشار الکترونیک: ۹۸/۱۰/۱۵
*نویسنده مسئول: mohammad_dehghan@mut.ac.ir

مقدمه

حامل‌های ژنتیکی، ابزاری‌هایی مهندسی‌شده و مصنوعی هستند که در همسانه‌سازی (Cloning) مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند. یک حامل ژنتیکی که حاوی قطعه ژنتیکی خارجی است، حامل ژنتیکی (Vector) نوترکیب نامیده می‌شود. حامل‌های ژنتیکی نوترکیب یا هیبریدی، ابزاری برای انتقال، تکثیر یا بیان چندین قطعه ژنتیکی مختلف به‌صورت هم‌زمان در یک یا چند میزبان خاص هستند [۱]. وجود قابلیت ویژه حامل‌های ژنتیکی در حمل قطعه‌های ژنتیکی مختلف می‌تواند برای رفع نیازهای آزمایشگاهی مانند عدم وجود کنترل مثبت ژنتیکی مناسب برای بعضی از عوامل میکروبی و ویروسی خاص استفاده شود. در واقع، ساخت حامل‌های ژنتیکی با یک یا چند توالی ژنتیکی مشخص، می‌تواند باعث شود که در هنگام نیاز به این قطعات با تکثیر یک کلنی از باکتری میزبان که حاوی حامل ژنتیکی مدنظر ما است، تعداد مناسب از قطعه مورد نظر را تکثیر کرده و از آن استفاده کنیم. یکی از اصلی‌ترین میزبان‌های باکتریایی مورد استفاده در همسانه‌سازی مولکولی، باکتری اشریشیاکُلی (E. Coli) با سویه‌های مهندسی‌شدهٔ مختلفی جهت استفاده در آزمایشگاه‌ها هستند؛ پرکاربردترین سویه این باکتری، DH5α است که اکثراً جهت اهداف تکثیری و ازیاد قطعات ژنتیکی موجود در حامل‌های ژنتیکی، مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲].

به دلیل انتشار سریع عوامل تهدیدآمیز که غالباً از طریق استنشاق است و همچنین نرخ مرگ‌ومیر بالا توسط آنها، تشخیص سریع و به‌موقع این عوامل بسیار حائز اهمیت است [۳]. روش‌های

تشخیصی وابسته به کشت و روش‌های ایمونولوژیک، نیازمند صرف وقت و هزینه بالایی هستند اما روش‌های تشخیصی مولکولی، نتایج سریع‌تر و قابل اطمینانی ایجاد می‌کنند [۴، ۵]. برای تشخیص این عوامل توسط روش‌های مولکولی با محدودیت‌هایی روبه‌رو هستیم که در ادامه به چند مورد اشاره می‌کنیم: ۱) با توجه به قوانین ایمنی، به‌دست‌آوردن اسیدهای نوکلئیک از گروه‌های عوامل تهدیدآمیز به منظور کالیبره‌کردن تکنیک‌ها و در واقع استفاده به عنوان کنترل مثبت بسیار دشوار است. ۲) در جهت اطمینان از عدم حضور این عوامل، همواره مجبور به آزمودن چند میکروارگانیسم به‌طور هم‌زمان و با استفاده از کنترل‌های مختلف هستیم [۶]. ۳)(حضور نتایج مثبت کاذب به علت آلودگی کنترل مثبت، مشکل‌ساز است. ۴) سطح تجهیزات آزمایشگاه‌های موجود و روش‌های رایج موجود در آزمایشگاه‌های بالینی و عدم دسترسی به تست‌های تجاری رایج یک محدودیت اصلی به شمار می‌رود [۷].

اگرچه استفاده از روش‌های شامل شبیه‌سازها، برای برطرف‌کردن بسیاری از مشکلات ناشی از مواجهه با عوامل تهدیدآمیز زیستی، ایده خوبی است اما تاکنون شبیه‌سازهای بسیار کمی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. در زمینه دفاع زیستی تعداد کمی شبیه‌ساز ازجمله هاگ‌های باسیلوس سوبتیلیس (به عنوان جایگزین باسیلوس آنتراسیس)، پانتوآ آگلومرانس (به عنوان جایگزین تمام باکتری‌های تهدیدکننده گیاهان) و باکتریوفاژ M13 (به عنوان جایگزین تمام تهدیدات ویروسی) مورد استفاده قرار گرفته‌اند؛ اما این شبیه‌سازها در روش‌های مبتنی بر اسیدنوکلئیک، بسیار ناکارآمد هستند زیرا هیچ ژن مشترکی با عوامل تهدیدآمیز واقعی که قرار است از آن تقلید کنند، نداشته و درنتیجه طراحی و ساخت حامل‌های ژنتیکی نوترکیب، روشی کارآمدتر است [۸].

حامل‌های ژنتیکی نوترکیب، دارای قطعات ژنتیکی مشابه با عوامل بیولوژیک هستند اما زمانی که به جای این عوامل استفاده می‌شوند، زیانی ندارند و تمامی مشکلات و نقص‌های اشاره‌شدهٔ فوق را مرتفع می‌کنند. امروزه به جای استفاده از عامل تهدیدآمیز زیستی واقعی مانند عامل‌های دارای ژنوم DNA (یعنی ویروس واریولا و باکتری فرانسیسلا، یرسینیا و بورخولدریا و غیره) از نوعی جایگزین ژنتیکی، به عنوان شبیه‌ساز عامل واقعی (کنترل مثبت) استفاده می‌شود. زیرا سازه هیبریدی شبیه‌ساز ژنتیکی و عامل زیستی تهدیدآمیز به گونه‌ای انتخاب می‌شوند که ویژگی‌های مشابهی (توالی‌های نوکلئیک اسیدی مربوطه) داشته باشند، با این تفاوت که غیربیماری‌زا هستند. از این نوع سازه‌های هیبریدی می‌توان به عنوان کنترل مثبت و در هر جایی که یک جانشین غیربیماری‌زا بتواند به صورت مؤثر جایگزین عوامل تهدیدآمیز واقعی شود، به جای یک عامل زیستی تهدیدآمیز استفاده نمود. یکی از اصلی‌ترین موانع موجود بر سر طراحی کیت‌های جدید بر پایه فرآیند PCR برای عوامل تهدیدآمیز زیستی، فقدان کنترل مثبت ژنتیکی مناسب برای آزمودن کارایی کیت تشخیصی (شامل پرایمرها یا پروب‌های موردنظر) است. درنتیجه، تولید این نوع از کنترل مثبت‌های ژنتیکی شبیه‌ساز از اولویت‌های پژوهشی حوزه پدافند زیستی کشور محسوب می‌شود.

هدف از این پژوهش در گام اول، طراحی نوعی از حامل‌های ژنتیکی بود که در آن قطعات مختلف ژنتیکی مرجع و ویژه چند عامل میکروبی یا ویروسی مشخص، همسانه‌سازی شده باشد و بتوان با پرایمرهای اختصاصی برای همان قطعه و با مقایسه قطعه تکثیری با قطعه تکثیرشده از آن ناحیه خاص در ژنوم خود ارگانیسم اصلی، از آن به عنوان کنترل مثبت در فرآیند PCR استفاده کرد. برای این منظور از میان عوامل بیولوژیک مختلف بر اساس اولویت‌های موجود در ایران، چهار عامل بیولوژیک فرانسیسلا، واریولا، بورخولدریا و یرسینیا به منظور قرارگیری در حامل هیبریدی انتخاب شدند [۷, ۱۵–۹]. از سوی دیگر، در گام دوم، بدلیل مزایای زیاد انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به صورت چندگانه نسبت به حالت یگانه، سازه و پرایمرهای مورد نظر را بر اساس یک واکنش PCR چهارگانه طراحی کردیم تا در مراحل بعدی بتوانیم از این اطلاعات و طراحی‌ها برای پیاده‌سازی کامل یک کیت تشخیصی چهارگانه براساس فرآیند PCR استفاده نماییم.

مواد و روش‌ها

انتخاب ژن حفاظت‌شده برای هر پاتوژن: در گام اول با هدف بالابردن دقت و صحت کار در شناسایی یک گونه یا عامل خاص، برای هر گونه (گونه‌ها) یک ناحیه اختصاصی با دقت بسیار بالا انتخاب شد که این ناحیه در سایر موجودات، به‌ویژه در دیگر گونه‌ها یا سویه‌های غیربیماری‌زای آن گونه یا گونه‌ها نیز حضور نداشت. به این منظور برای یافتن ژن‌های کاملاً محافظت‌شدهٔ چهار عامل پاتوژن فرانسیسلا، واریولا، بورخولدریا و یرسینیا ، مقالات مرتبط در پایگاه دادهٔ NCBI و INSDC مورد ارزیابی قرار گرفتند [۲۱–۱۶].

تهیه توالی مربوط به هر ژن: برای تهیه توالی ژن‌ها از پایگاه داده NCBI استفاده شد. این پایگاه داده مرکزی، اطلاعات مربوط به ژن‌ها و رونوشت‌های آنها، پروتئین‌ها و امکانات بسیار زیادی مربوط به علوم زیستی را فراهم می‌نماید [۲۲].

تعیین توالی حفاظت‌شده هر ژن: برای تعیین توالی حفاظت‌شده هر ژن از نرم افزار BioEdit 7.0.5.3 استفاده شد. BioEdit نرم‌افزار قدرتمندی جهت هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها به کمک روش Clustalw Multiple Alignment است [۲۳].

جدول ۱) ویژگی پرایمرهای طراحی‌شده

نام پاتوژن	ژن هدف		توالی پرایمر	طول پرایمر	Tm	GC%	سایز قطعه
فرانسیسلا	fopA	F	5′- TGCAGCTAATAATTTCATTGCTCC	۲۴	۵۸/۲	۳۷/۵	۲۱۰ bp
		R	5′- CTACACCTAAGTACCACTGGC	۲۱	۵۷/۵	۵۲/۴	
واریولا	HA	F	5′- AATCCACAACAGACAAGACGT	۲۱	۵۷/۸	۴۲/۹	۳۳۳ bp
		R	5′- ACCAAATACTTTGACATAGTC	۲۱	۵۱/۲	۳۲/۳	
بورخولدریا	16srRNA	F	5′- TTCTGGCTAATACCCGGACTG	۲۱	۵۹/۲	۵۲/۴	۴۳۸ bp
		R	5′- TATCTAATCCTGTTTGCTCC	۲۰	۵۲	۴۲/۹	
یرسینیا	caf1	F	5′- AAAATCAGTTCCGTTATC	۱۸	۴۷/۱	۳۳/۳	۶۰۰ bp
		R	5′- TTAGATACGGTTACGGTT	۱۸	۴۹/۷	۳۸/۹	

طراحی پرایمر: به منظور طراحی پرایمر از نرم‌افزار Oligo 7 استفاده شد. Oligo یک نرم‌افزار ضروری جهت طراحی و تجزیه و تحلیل پرایمرهای PCR است. در این مرحله، توالی تهیه‌شده به نرم‌افزار Oligo منتقل و برای نواحی حفاظت‌شدهٔ هر ژن پرایمرهای پیشرو و پیرو طراحی شد و مجموعه حالت‌های مختلف بررسی پرایمرها به‌صورت تصادفی، جهت طراحی مطلوب‌ترین پرایمرها از نظر دایمر، درصد CG، طول محصول، پایداری، دمای اتصال و غیره مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی اختصاصی‌بودن پرایمرها: در این مرحله میزان اختصاصی‌بودن جفت پرایمرهای هر عامل با استفاده از ابزار PrimerBlast در پایگاه دادهٔ NCBI با انتخاب بانک دادهٔ NR بررسی شدند. جهت بررسی تشخصی‌پذیری ۱۰۰٪ حالت چهارگانه به‌طوری که پرایمرها تنها چهار محصول مدنظر ما را تولید کنند (قطعات غیراختصاصی تولید نشود)؛ این هشت پرایمر به صورت دوبه‌دو و تصادفی (۳۲ حالت) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل پرایمرها: پس از طراحی اولیه، تجزیه و تحلیل پرایمرهای عوامل مختلف در بررسی شد و بر اساس ویژگی هایی همچون تشکیل دایمر و پایداری، OligoAnalyzer مرحلهٔ اول با استفاده از ابزار برخط پرایمرهای مناسب طراحی شدند. در مرحله‌ی بعدی نیز با استفاده از ابزار PrimerBlast در پایگاه دادهٔ NCBI با انتخاب بانک داده‌ی NR، پرایمرهای عوامل مختلف به صورت دوبه دو با هدف عدم شناسایی هیچ عاملی، بررسی و تأیید شدند.

طراحی سازهٔ هیبریدی: در این مرحله تغییرات خاصی در ناحیه ژنی هدف به منظور قرارگیری در سازه انجام شد که در ادامه بیان می‌گردد:

۱- توالی با طول ۱۰۰ bp برای داخل توالی‌ها در نظر گرفته شد که دارای جایگاه‌های برش EcoRI و NotI بود. این قطعه به دو منظور اضافه گردید: اول، در صورت آلودگی نمونهٔ اصلی با کنترل مثبت، حذف آنزیمی صورت پذیرد (پیشگیری از جواب مثبت کاذب). دوم، تفاوت اندازه‌ای میان هر عامل روی سازه نسبت به اندازهٔ طبیعی در نمونهٔ اصلی ایجاد شود که در صورت عمل‌نکردن آنزیم‌ها، با کمک این تفاوت سایز بر ژل آگارز، جواب قطعی فراهم شود.

۲- توالی با طول ۴۸ bp برای بین توالی‌ها درنظر گرفته شد که دارای جایگاه‌های برش XhoI و BamHI بود. پیش‌تیمار آنزیمی این قطعه قبل از شروع PCR موجب جلوگیری از تولید قطعات ناخواسته و همچنین تکثیر هر پرایمر در محدودهٔ خودش می‌شود.

۳- توالی با طول ۳۰ bp برای دو طرف کل توالی نهایی در نظر گرفته شد که دارای جایگاه برش SacI است که به منظور همسانه‌سازی و جداسازی، قرار داده شد.

تهیه حامل نوترکیب: به منظور طراحی حامل نوترکیب از نرم‌افزار SnapGene 3.2.0.1 استفاده شد. در دو طرف سازه نیز جایگاه برش آنزیم SacI قرار داده شد.

تأییدیهٔ سازه به وسیله شبیه‌سازی واکنش PCR: به منظور تأیید طراحی‌های صورت‌گرفته، واکنش PCR در نرم‌افزار

جدول ۲) بررسی اختصاصیت ۴ جفت پرایمر به صورت دو به دو:

فرانسیسلا تولارنسیس (F1 و R1)- واریولا (F2 و R2)- بورخولدریا (F3 و R3)- یرسینیا پستیس (F4 و R4)

انواع حالات	F1 F1	F1 F2	F1 F3	F1 F4	F2 F2	F2 R2	F2 F3	F2 F4	F3 F3	F3 F4	F3 R1	F4 F4	F4 R1	F4 R2	F4 R3	F4 R4
نتایج	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
طول محصول	–	–	–	–	–	۲۳۳	–	–	–	–	۱۱۰	–	–	–	–	–

انواع حالات	R3 R3	R3 R4	F3 R3	F1 R2	F1 R4	F1 R3	F1 R4	F2 R1	F2 R3	F2 R4	F3 R1	F3 R2	F3 R4	F4 R4	F4 R1	F4 R2	F4 R3	R2 R4
نتایج	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
طول محصول	–	–	۳۳۸	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۵۰۰	–	–	–	–

شکل ۱) شماتیک سازه، به ترتیب از چپ به راست: جایگاه برش *SacI*، توالی *فرانسیسلا تولارنسیس* (آبی) با دو جایگاه برش *EcoRI* و *NotI*، توالی بین ژن ۱۰۰ bp با دو جایگاه برش *XhoI* و *BamHI*، توالی *واریولا*(سبز) با دو جایگاه برش *EcoRI* و *NotI*، توالی بین ژنی ۱۰۰ bp با دو جایگاه برش *XhoI* و *BamHI*، توالی *بورخولدریا* (قرمز) با دو جایگاه برش *EcoRI* و *NotI*، توالی بین ژنی ۱۰۰ bp با دو جایگاه برش *XhoI* و *BamHI*، توالی *پرسینیا پستیس* (زرد) با دو جایگاه برش *EcoRI* و *NotI*، جایگاه برش *SacI*.

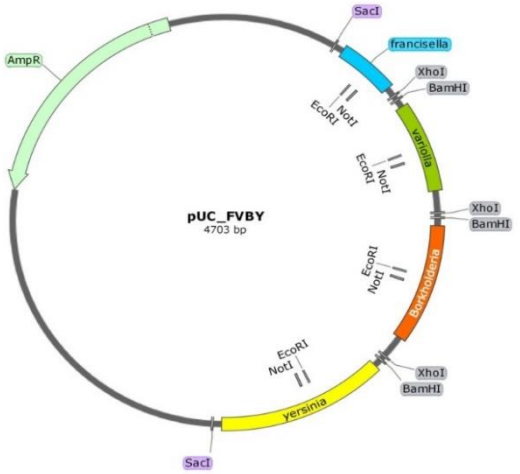
SnapGene شبیه‌سازی و ژل آگارز حاصل از این شبیه‌سازی تهیه گردید.

یافته‌ها

انتخاب بهترین ژن حفاظت‌شده برای هر پاتوژن: براساس مقالات بررسی‌شده [۲۱-۱۶]، ژن‌های محافظت‌شده برای پاتوژن‌های فرانسیسلا تولارنسیس، یرسینیا پستیس، بورخولدریا مالئی و سودومالئی، ویروس واریولا به ترتیب fopA، caf1، 16srRNA و HA تعیین شدند.

تهیه توالی‌های مربوط به هر ژن: تمام توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI، مربوط به چهار ژن فوق به فرمت FASTA استخراج و ذخیره شدند.

تعیین توالی حفاظت‌شدهٔ هر ژن: توالی‌های ذخیره‌شده در مرحلهٔ قبل هم‌ردیف‌سازی و نواحی حفاظت‌شدهٔ هر ژن به منظور قرارگیری بر سازهٔ نهایی تعیین شدند.



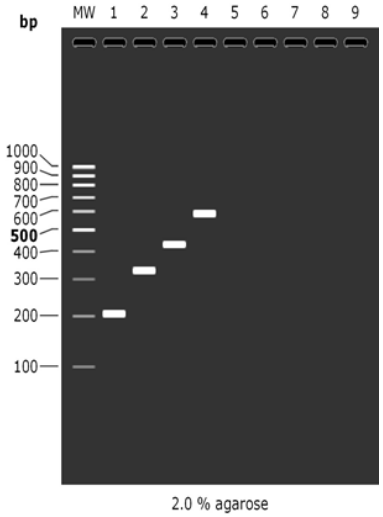
شکل۲) شماتیک وکتور هیبریدی: کلون سازهٔ هیبریدی با طول ۲۰۲۳ bp (جایگاه برش *SacI*، توالی *فرانسیسلا تولارنسیس* (آبی) با دو جایگاه برش *EcoRI* و *NotI*، توالی بین ژنی ۱۰۰ bp با دو جایگاه برش *XhoI* و *BamHI*، توالی *واریولا* (سبز) با دو جایگاه برش *EcoRI* و *NotI*، توالی بین ژنی ۱۰۰ bp با دو جایگاه برش *XhoI* و *BamHI*، توالی *بورخولدریا* (قرمز) با دو جایگاه برش *EcoRI* و *NotI*، توالی بین ژنی ۱۰۰ bp با دو جایگاه برش *XhoI* و *BamHI*، توالی *پرسینیا پستیس* (زرد) با دو جایگاه برش *EcoRI* و *NotI*، جایگاه برش *SacI*) در وکتور PUC57 با طول ۲۷۱۰ bp دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین و درنهایت ایجاد یک وکتور هیبرید با طول ۴۷۰۳ bp.

طراحی پرایمر: نتایج حاصل از بررسی مجموعه حالت‌های مختلف پرایمرها به صورت تصادفی، جهت طراحی مطلوب‌ترین پرایمر در جدول ۱ قابل مشاهده است.

تأییدیهٔ اختصاصی‌بودن پرایمرها: در این مرحله تشخیص‌پذیری ۱۰۰٪ جفت پرایمرهای هر عامل طراحی‌شده، تأیید شد. علاوه بر این در حالت چهارگانه نیز چهار جفت پرایمر مشابه حالت یگانه، کاملاً اختصاصی عمل کردند (جدول ۲).

طراحی سازهٔ هیبریدی: پس از اعمال تغییرات اشاره‌شده در مواد و روش و قراردادن توالی‌ها در کنار یکدیگر، مطابق با شکل ۱ یک توالی ۲۰۲۳ نوکلئوتیدی برای قرارگیری در سازهٔ هیبریدی ایجاد شد.

تهیه حامل نوترکیب: سازهٔ مدنظر از سایت برش آنزیم SacI در پلاسمید PUC57 کلون و حامل نوترکیب مطابق با شکل ۲ طراحی گردید.



شکل ۳) شبیه‌سازی ژل آگارز (مارکر مولکولی ۱۰۰ bp)، به ترتیب *فرانسیسلا تولارنسیس* (۲۱۰ bp)، *واریولا* (۳۳۳ bp)، *بورخولدریا* (۴۳۸ bp) و *یرسینیا پستیس* (۶۰۰ bp)

تأییدیهٔ سازه به وسیله شبیه‌سازی واکنش PCR: با شبیه‌سازی واکنش PCR ژل آگارز ۲٪ مشاهده شد (شکل ۳). بر این اساس، قطعات شبیه‌سازی‌شده در PCR با سایزهای مورد انتظار یکسان بود. برای پاتوژن‌های فرانسیسلا، واریولا، بورخولدریا و واریولا به ترتیب قطعاتی با سایزهای ۲۱۰، ۳۳۳، ۴۳۸ و ۶۰۰ نوکلئوتید مورد انتظار بود.

بحث

در این پژوهش، یک سازه هیبریدی شبیه‌ساز ژنتیکی به همراه انواع پرایمرهای موردنیاز در فرآیند PCR به صورت چندگانه برای شناسایی ۴ عامل تهدیدآمیز دارای DNA به‌صورت بیوانفورماتیکی طراحی شد. اسناد بسیار کمی در مورد سابقه استفاده از این نوع حامل‌های هیبریدی در سطح جهان در فضای اینترنت منتشر شده است.در یک مطالعه که در سال ۲۰۰۴ و در کشور فرانسه انجام پذیرفته است از این نوع حامل‌های ژنتیکی هیبریدی، به منظور فراهم‌آوری نوعی کنترل مثبت با هدف غلبه بر مشکلات عدیده‌ای که در راه تشخیص عوامل بیماری‌زای خطرناک با آن مواجه بوده‌اند، استفاده شده است. در این آزمایش دو پلاسمید مختلف به عنوان کنترل مثبت طراحی شده است که به ترتیب دارای چهار و شش توالی ژنتیکی از عوامل بیماری‌زای خطرناک هستند. همچنین پرایمرها و پروب‌هایی برای تشخیص هر قطعه، چه بر روی پلاسمید کنترل مثبت و چه بر روی عوامل اصلی، طراحی کرده‌اند. در این آزمایش توالی اصلی با جایگزینی نوکلئیک‌اسیدهای دیگر، تغییر داده شده است بدین‌گونه که هشت نوکلئوتید آن با ۲۰ نوکلئوتید که حاوی جایگاه برش آنزیم برشگر NotI بود [۲۴].

از دیگر مطالعات انجام‌شده در این حوزه می‌توان به دو ثبت اختراع در آمریکا اشاره کرد که در سال ۲۰۰۸ به ثبت رسیده است که در طی آن، نوعی شبیه‌ساز به‌صورت هم‌زمان، توالی‌های ویژه مربوط به بیش از ۲۰ عامل زیستی تهدیدآمیز را شامل می‌شود. در این تحقیق از جایگاه برش BamHI برای بین توالی‌ها استفاده شده است [۲۸–۲۵]. در مطالعهٔ دیگر در ایران *زین‌الدینی* و همکاران در سال ۲۰۱۹ از یک سازه هیبریدی برای تشخیص هم‌زمان فرانسیسلا و یرسینیا در روش PCR چندگانه استفاده کرده‌اند. در این تحقیق ژن fopA از فرانسیسلا و ژن caf1 از یرسینیا انتخاب شده است که به ترتیب قطعاتی با سایز ۱۰۷, ۱۷۶ نوکلئوتیدی ایجاد کرده‌اند [۲۹]. در دو مطالعه‌ای که در انستیتوپاستور ایران در مورد عوامل فرانسیسلا و یرسینیا انجام گرفته، یک سازهٔ هیبریدی به عنوان کنترل مثبت به‌صورت یگانه طراحی و استفاده شده است [۳۰، ۳۱].

ازجمله محدودیت‌های پژوهش می‌توان به عدم دسترسی آزاد به سویه‌ها اشاره کرد و پیشنهاد می‌شود با توجه به ضرورت وجود کنترل مثبت‌های ژنتیکی در روند شناسایی عوامل پاتوژن خطرناک، امید است براساس نتایج حاصل از این پژوهش، درنهایت یک کیت عملیاتی حاصل آید. پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی به منظور افزایش ضریب دقت ژن‌های بیشتری بررسی شوند یا طراحی این پروژه با پروب انجام شود و نرم‌افزاری به منظور شبیه‌سازی شرایط Multiplex PCR نیز طراحی گردد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، یک سازه هیبریدی شبیه‌ساز ژنتیکی به همراه انواع پرایمرهای موردنیاز در فرآیند PCR به صورت چندگانه برای شناسایی چهار عامل تهدیدآمیز دارای DNA به‌صورت بیوانفورماتیکی طراحی شده است تا بتوان با استفاده از آن به عنوان کنترل مثبت، در شرایط اضطراری بدون شک و تردید و با اطمینان بیشتر این‌گونه عوامل را شناسایی کنیم.

تشکر و قدردانی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.
تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.
تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.
سهم نویسندگان: مونا سیم‌خواه (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی (۳۰٪)؛ محمدجواد دهقان عصمت‌آبادی (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی (۳۰٪)، مهدی زین‌الدینی (نویسنده سوم) پژوهشگر کمکی (۲۰٪)، نفیسه پورمهدی (نویسنده چهارم) پژوهشگر کمکی (۲۰٪).
منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

References

1- Brown T A. Gene cloning and DNA analysis: An introduction. 7th ed. United States: Wiley-blackwell.; 2016. Chapter 2, Vectors for gene cloning: Plasmids and bacteriophage; p. 13-24.
2- Kostylev M, Otwell A.E, Richardson R, Suzuki Y. Cloning should be simple: Escherichia coli DH5α-mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. PLoS ONE. 2015;10(9):e0137466.
3- Janse I, Hamidjaja R.A., Bok J.M, Rotterdam B.V. Reliable detection of Bacillus anthracis, Francisella tularensis and Yersinia pestis by using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification. BMC Microbiol. 2010;10(1):314-26.
4- Matero P, Hemmila H, Tomaso H, Piiparinen H, Rantakokko-Jalava K, Nuotio L, et al. Rapid field detection assays for Bacillus anthracis, Brucella

spp., Francisella tularensis and Yersinia pestis. Clin Microbiol Infect. 2011;17(1):34-43.
5- Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, Tärnvik A. Detection of Francisella tularensis in ulcers of patients with tularemia by PCR. J Clin Microbiol. 1997;35(5):1045-8.
6- Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Friedlander AM, et al. Anthrax as a biological weapon: medical and public health management. Working group on civilian biodefense. JAMA. 1999;281(18):1735-45.
7- Payne, D.A, Petersen J. Rapid molecular testing for bioterrorism agents: Targets, tactics, and technology. J Clin Ligand Assay, 2002;25(4):348-57.
8- Carrera M, Sagripanti J-L. Design and engineering of a multi-target (multiplex) DNA simulant to evaluate nulceic acid based assays for detection of biological threat agents. Edgewood chemical biological center aberdeen proving ground MD, 2006.
9- Allen L.A. Mechanisms of pathogenesis: evasion of killing by polymorphonuclear leukocytes, Microbes Infect. 2003;5(14):1329-35.
10- Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. Clin Microbiol Rev. 2005;18(2):383-416.
11- Dance D A B. Melioidosis and glanders as possible biological weapons. In: Fong, I W, Alibek, Kenneth, editors. Bioterrorism and infectious agents: a new dilemma for the 21st century. Netherlands: Springer; 2009. pp. 99-145.
12- Estrada-de los Santos P, Vinuesa P, Martínez-Aguilar L, Hirsch AM, Caballero-Mellado J. Phylogenetic analysis of Burkholderia species by multilocus sequence analysis. Curr Microbiol. 2013;67(1):51-60.
13 - Schrallhammer M, Schweikert M, Vallesi A, Verni F, Petroni G. Detection of a novel subspecies of Francisella noatunensis as Endosymbiont of the Eiliate Euplotes raikovi. Microbl Ecol. 2011;61(2):455-64.
14- Smallpox, [Internet]. Wikipedia, [cited 2019 Dec 10]. Availablefrom:https://en.wikipedia.org/wiki/Smallpox.
15- Ray C.G, Ryan K.J. Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases. 4th ed. United States: McGraw-Hill; 2004. p.992.
16- Fujita O, Tatsumi M, Tanabayashi K, Yamada A. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of Francisella tularensis. Japan j infect diseas. 2006;59(1):46.
17- Fulop M, Leslie D, Titball R. A rapid, highly sensitive method for the detection of Francisella tularensis in clinical samples using the polymerase chain reaction. Am j tropic med hygiene. 1996;54(4):364-6.
18- Ho C-C, Lau CC, Martelli P, Chan S-Y, Cindy W, Wu AK, et al. Novel pan-genomic analysis approach in target selection for multiplex PCR identification and detection of Burkholderia pseudomallei, Burkholderia thailandensis, and Burkholderia cepacia complex species: a proof-of-concept study. J clin microbiol. 2011;49(3):814-21.
19- Lee M-A, Wang D, Yap EH. Detection and differentiation of Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei and Burkholderia thailandensis by multiplex PCR. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;43(3):413-7.
20- Pourmahdi N, Zeinoddini M, Esmatabadi D, Javad M, Sheikhi F. Simple and rapid detection of yersinia pestis and francisella tularensis using multiplex-PCR. Res Molecul Med. 2018;6(4).
21- Ropp SL, Jin Q, Knight JC, Massung RF, Esposito JJ. PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. J Clin Microbiol. 1995;33(8):2069-76.
22- Agarwala R, Barrett T, Beck J, Benson D.A, Bollin C, Bolton E, et al. Database resources of the national center for biotechnology information. Nucleic Acids Res. 2017; 45(Database issue): D12–D17.
23- Hall T. BioEdit: an important software for molecular biology. GERF Bull Biosci, 2011;2(1):60-1.
24- Charrel R.N, La Scola B, Raoult, D. Multi-pathogens equence containing plasmids as positive controls for universal detection of potential agents of bioterrorism. BMC Microbiol. 2004;4(1):21-32.
25- Carrera M, Sagripanti JL. Non-infectious plasmid engineered to simulate multiple viral threat agents. J Virol Methods. 2009;159(1):29-33.
26- Carrera M, Sagripanti JL. Artificial plasmid engineered to simulate multiple biological threat agents. Appl Microbiol Biotechnol. 2009;81(6):1129-39.
27- Sagripanti, JL, Carrera M, inventors; US Secretary of Army. Artificial chimeras engineered to simulate multiple biological threat agents. United States patent US 8017330. 2011.
28- Sagripanti, JL, Zandomeni MC, inventors; US Secretary of Army. Method for simultaneously detecting multiple biological threat agents. United States patent US 8367327. 2013.

29- Pourmahdi N, Zeinoddini M, Dehghan Esmatabadi MJ, Sheikhi F. Simple and Rapid Detection of Yersinia pestis and Francisella Tularensis using Multiplex-PCR. Research in Molecular Medicine, 2018. 6(4):28-37
30- Rohani M, Mohsenpour B, Ghasemi A, Esmaeili S, Karimi M, Neubauer H, et al. A case report of human tularemia from Iran. 2018;10(4):250-3.
31- Mostafavi E, Ghasemi A, Rohani M, Molaeipoor L, Esmaeili S, Mohammadi Z, et al. Molecular survey of tularemia and plague in small mammals from Iran. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:215.