ششمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
۲۴-۲۲ مردادماه ۱۳۸۸، سالن همایشهای برج میلاد
The 6th National Biotechnology Congress of Iran
13-15 Aug, 2009, Milad Tower Conference Hall, Tehran-Iran

معرفی ابزار بیوانفورماتیک BIBI در شناسایی باکتری‌ها با استفاده از تکثیر ژن 16S rRNA و تعیین توالی

زهرا پوررمضان گیل چالان*، محمد رعایایی اردکانی، غلامرضا قزلباش
مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز
z.pourramezan@gmail.com

چکیده

بخشی از DNA که برای اهداف تاکسونومیک به‌کار می‌رود، ژن 16S rRNA می‌باشد. از آنجایی‌که ژن 16SrRNA در باکتریها عمومیت دارد، روابط میان تمام باکتریها را توسط این ژن می‌توان اندازه‌گیری کرد. توالی ژن 16SrRNA، ۱۵۵۰جفت باز می‌باشد که شامل نواحی حفاظت شده و متغیر می‌باشد. پرایمرهای عمومی به‌کار رفته معمولا مکمل نواحی حفاظت شده در ابتدای ژن می‌باشد که توالی نواحی متغیر در میان آنها برای تاکسونومی مقایسه‌ای به‌کار می‌رود. بعد از تکثیر توالی مورد نظر از این ژن و ناحیه تکثیرشده، تعیین توالی می‌گردد. سپس توالی سویه ناشناخته مورد نظر با توالی‌های شناخته شده مقایسه گردیده و فاصله فیلوژنیک آن‌ها مشخص می‌شود(۲). چندین پکیج نرم‌افزار مقایسه‌ای دردسترس وجود دارد که از معمولترین آنها، نرم‌افزارهای Blast، Phylip، BIBI[1] می‌باشند که برای شناسایی باکتریها با استفاده از آنالیز توالی DNA طراحی شده‌اند. از میان آنها، BIBI Database، یک وب سایت فوق العاده می‌باشد که ۱۹۴ پکیج نرم افزاری را با هم مقایسه می‌کند و ۱۶ سرور مجانی در ایجاد درختچه فیلوژنیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به‌اینکه Blast به تنهایی و بدون داشتن اطلاعات فیلوژنیک برای انجام شناسایی باکتریها مناسب نمی‌باشد، BIBI علاوه بر آنالیز داده‌ها، امکان سریع به درختچه فیلوژنیک را فراهم می‌آورد. در این تحقیق، ۱۵۰۰ جفت باز از ژن 16S rRNA باکتریهای اسید استیک جداسازی شده از طبیعت که قادر به تولید سلولز باکتریایی بودند با استفاده از پرایمرهای عمومی تکثیر گردید. در مرحله بعد با تعیین توالی ژن 16S rRNA توالی سویه ناشناخته مورد نظر با استفاده از ابزار بیوانفورماتیک BIBI با توالی‌های نوکلئوتید موجود در بانک اطلاعات ژنی تطبیق داده شد. این مقایسه تمایز میان ارگانیسم‌ها را در سطح جنس در تمام شاخه‌های اصلی باکتری‌ها ممکن ساخته و به‌علاوه با ترسیم درختچه فیلوژنیک و تعیین فاصله فیلوژنیک، سویه‌ها را در سطح گونه نیز طبقه‌بندی کرد(۳).

واژه های کلیدی: ژن 16S rRNA، پرایمر عمومی، نرم افزار بیوانفورماتیک، BIBI Database، درختچه فیلوژنیک.

مقدمه

اگر هدف شناسایی یک میکروارگانیسم ناشناخته براساس هیچگونه دانش اولیه‌ای باشد، توالی ژن 16S rRNA برای این منظور به‌کار می‌رود. از آنجایی‌که ژن 16SrRNA در باکتریها عمومیت دارد، روابط میان تمام باکتریها را توسط این ژن می‌توان اندازه‌گیری کرد. بنابراین مقایسه میان توالی ژن 16SrRNA، تمایز میان ارگانیسم‌ها را در سطح جنس در تمام شاخه‌های اصلی باکتری‌ها ممکن می‌سازد و به‌علاوه می‌توان سویه‌ها را در سطوح چندگانه شامل سطح گونه و زیرگونه طبقه‌بندی کرد. برای اولین

[1] . Bioinformatics Bacterial Identification

بار در دهه ۱۹۸۰ توسط Woese و همکاران نشان داده شد که روابط فیلونیک باکتریها را می‌توان توسط مقایسه یک بخش ثابت از کد ژنتیکی نشان داد(۸). در سال ۱۹۶۰، Dubnau و همکاران حفاظت در توالی ژن 16SrRNA در باسیلوس سوبتیلیس شرح دادند(۳) و کاربرد وسیع توالی این ژن برای شناسایی باکتری‌ها و تاکسونومی توسط Woese و همکاران دنبال شد که خصوصیات مهم این توالی ژن را تشریح کردند و بیان داشتند که این توالی به‌صورت یک کورنومتر مولکولی عمل می‌کند(۹).
توالی ژن 16SrRNA، ۱۵۵۰جفت باز می‌باشد که شامل نواحی حفاظت شده و متغیر می‌باشد. پرایمرهای عمومی به‌کار رفته معمولا مکمل نواحی حفاظت شده در ابتدای ژن و در ناحیه ۵۴۰ جفت باز و یا در انتهای توالی کامل (درحدود نواحی ۱۵۵۰ جفت باز) می‌باشد که توالی نواحی متغیر در میان آنها برای تاکسونومی مقایسه‌ای به‌کار می‌رود. ۵۰۰ جفت باز و ۱۵۰۰ جفت باز از طولهای معمول برای تعیین توالی و مقایسه می‌باشند. ۵۰۰ جفت باز توالی اولیه، تمایز مناسبی را برای شناسایی فراهم می‌کند، چون این ناحیه تنوع بیشتری را نشان می‌دهد. حتی برخی از محققان شناسایی‌شان را با استفاده از تعیین توالی حدود ۴۰۰ جفت باز و حتی ۲۰۰ جفت باز انجام داده‌اند.
بعد از تکثیر و تعیین توالی ژن 16SrRNA، توالی سویه ناشناخته مورد نظر با توالی‌های شناخته شده مقایسه گردیده و فاصله فیلوژنیک آن‌ها مشخص می‌شود. چندین پکیج نرم‌افزار مقایسه‌ای دردسترس وجود دارد که از معمولترین آنها، نرم‌افزارهای Blast، Phylip، BIBI می‌باشند که برای شناسایی باکتریها با استفاده از آنالیز توالی DNA طراحی شده‌اند. از میان آنها، BIBI Database، علاوه بر آنالیز داده‌ها، امکان سریع به درختچه فیلوژنیک را فراهم می‌آورد و به‌دلیل به‌روز بودن اطلاعات آن و ارائه درختچه فیلوژنیک در کوتاهترین زمان ممکن(کمتر از ۱ دقیقه) در شناسایی فیلوژنیک باکتری‌ها با استفاده از ژن 16SrRNA بر نرم‌افزارهای بیوانفرماتیک دیگر برتری دارد. بنابراین در مطالعه حاضر نیز از این ابزار بیوانفورماتیک استفاده گردید.

مواد و روشها

جداسازی باکتریهای اسید استیک تولیدکننده سلولز

نمونه‌هایی چون سرکه خانگی، میوه، آبمیوه‌های الکلی، گلها به‌عنوان منابع جداسازی باکتریهای اسید استیک تولیدکننده سلولز مورد استفاده قرار گرفتند. هر نمونه در محیط غنی‌سازی حاوی ۲٪ گلوکز، ۱٪ عصاره مخمر، ۵٪ اتانل و ۲۵۰۰۰۰ واحد در هر ۱۰۰ میلی لیتر از آمفوتریسین B که pH محیط برابر ۵ تنظیم گردید، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳-۵ روز به‌صورت شیک کشت داده شد. جدایه‌ها در محیط حاوی۰/۵٪ گلوکز، ۰/۵٪عصاره مخمر و ۱/۵٪ آگار برای دو روز کشت داده شدند. برای بررسی تولید سلولز، تمام جدایه‌ها در محیط HS حاوی ۲٪ گلوکز، ۰/۵٪ پپتون، ۰/۵٪ عصاره مخمر، ۰/۲۷٪ دی سذیم فسفات و ۰/۱۱۵٪ سیتریک اسید که pH محیط برابر ۶ تنظیم شده بود، برای مدت ۲ روز در ۳۰ درجه سانتیگراد کشت داده شد و جدایه‌های تولیدکننده پلیکل سلولز جداسازی شدند(۵).

تعیین خصوصیت فیلوژنیک باکتریها

بعد از کشت دو روزه باکتری‌ها در محیط نوتزینت براث و استخراج ژنوم بااستفاده از کیت استخراج ژنوم ژن فناوران، توالی ۱۵۰۰ جفت بازی ژن 16S rDNAتوسط جفت پرایمر
fD1 (5′-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)
rP1 (5′-CCCGGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT -3′) تکثیر یافت. پارامترهای چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل دناتوره کردن آغازین به مدت ۳ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۳۰ چرخه: ۱ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در ۶۲ درجه سانتیگراد و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد، به‌علاوه یک چرخه

اضافی طویل‌سازی ۲۰ دقیقه‌ای در۷۲ درجه سانتیگراد، می‌باشد. قطعه تکثیر یافته تخلیص شده و در Tag Copen Hagen A/S در دو جهت تعیین توالی گردید(۷).

ابزار بیوانفورماتیک

در مطالعه حاضر برای برای شناسایی باکتریها با استفاده از آنالیز توالی DNA از برنامه BIBI استفاده شد. این برنامه دو ابزار بیوانفورماتیک معروف به‌نامهای Blast (۱) و Clustal W (۶) را به‌طور همزمان به‌کار می‌برد. عملکردهای Clustal W توسط استفاده از نتایج پیش هم‌ترازی Blast تسریع می‌گردد. آنالیز توالی در ۴ مرحله صورت می‌گیرد: ۱-بررسی برای تطبیق توالی سویه ناشناخته مورد نظر با توالی‌های ذخیره‌شده از قبل در GenBank، بزرگترین بانک اطلاعاتی توالی‌های نوکلئوتید که بیش از ۲۰ میلیون توالی ذخیره را که بیش از ۹۰۰۰۰ از این توالی‌ها مربوط به ژن16SrRNA می‌باشد. ۲- فیلتر کردن نتایج Blast و استخراج و ذخیره آن در فرمت Fasta. ۳- هم‌ترازی توالی توسطClustal W . ۴- نشان دادن نتایج به صورت ۳ فایل متفاوت: هم‌ترازی توالی، درختچه فیلوژنیک و فاصله‌های فیلوژنیک(۲).

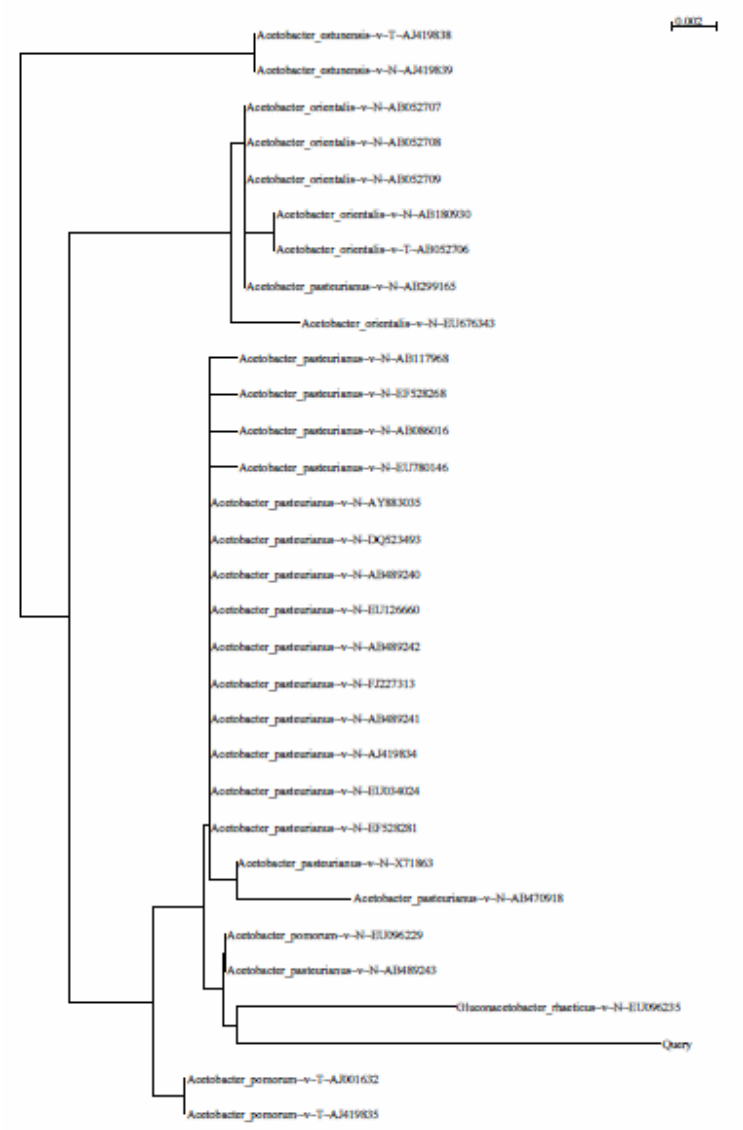
نتایج و بحث

بر اساس نتایج تعیین توالی، جدایه‌ها متعلق به جنس *استوباکتر* می‌باشند. جدایه Z از لحاظ فیلوژنیک شباهت زیادی با *استوباکتر استونسیس*[۲] دارد و جدایه g نیز شباهت زیادی با باکتری *استوباکتر استی*[۳] دارد که دو جدایه غیرمولد سلولز می‌باشند. ۵ جدایه مولد سلولز مربوط به گونه *استوباکتر پاستوریانوس* می‌باشند (جدول۱). درختچه فیلوژنیک مربوط به جدایه B۲-۴ پربازده‌ترین سویه مولد سلولز، با استفاده از ابزار بیوانفورماتیک BIBI در تصویر ۱ ارائه گردیده است.

جدول ۱- بیشترین تشابه باکتری‌های جداسازی‌شده با باکتری‌های ذخیره‌شده در GenBank بعد از هم ترازی توالی‌های ژن 16SrRNA در BIBI Database.

نام جدایه‌ها	بیشترین تشابه با باکتری
B-۲۷	*استوباکتر پاستوریانوس* سویه AUC29
B-۲۴	*استوباکتر پاستوریانوس* سویه LMG1629
V-۹	*استوباکتر پاستوریانوس* سویه AUC25
V-۲	*استوباکتر پاستوریانوس* سویه BAC24
T-۱۰	*استوباکتر پاستوریانوس* سویه CCM3606
Z	*استوباکتر استونسیس* سویه CCM3613
g	*استوباکتر استی* سویه LMG1531

[2] . *Acetobacter estunensis* CCM 3613
[3] . *Acetobacter aceti*



تصویر ۱- درختچه فیلوژنیک جدایه ۲-B۴.

منابع

1- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

۲- Clarridge III, JE. 2004 Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious disease [online]. Clin. Microbiol. Rev. 17: 840–862. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.

۳- Devulder, G., Perriere, G., Baty, F., and Flandrois, J-P. 2003. BIBI, a Bioinformatics Bacterial Identification tool [online]. J. Clin. Microbiol. 41:1785–1787. doi: 10.1128/JCM.41.4.1785-1787.2003

٤- Dubnau, D., I. Smith, P. Morell, and J. Marmur. 1965. Gene conservation in *Bacillus* species. I. Conserved genetic and nucleic acid base sequence
homologies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54:491–498.

٥- Pourramezan, Z.G., .*, Roayaie, A. M., and Qezelbash, Q.R. 2009. Optimization of culture condition for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. 4B-2. Biotechnology 8(1): 150-154.

٦- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680.

7- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 60: 407–438.

8- Woese, C. R., E. Stackebrandt, T. J. Macke, and G. E. Fox. 1985. A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. Syst. Appl. Microbiol. 6:143–151

9- Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51:221–271.

Abstract

The part of the DNA now most commonly used for taxonomic purposes for bacteria is the 16S rRNA gene. The 16S rRNA gene is universal in bacteria, and so relationships can be measured among all bacteria. The 16S rRNA gene sequence is about 1,550 bp long and is composed of both variable and conserved regions. The gene is large enough, with sufficient interspecific polymorphisms of 16S rRNA gene, to provide distinguishing and statistically valid measurements. Universal primers are usually chosen as complementary to the conserved regions at the beginning of the gene and at either the 540-bp region or at the end of the whole sequence (about the 1,550-bp region), and the sequence of the variable region in between is used for the comparative taxonomy. Several sequence-comparing software packages are available. We generally use the proprietary software that comes with the MicroSeq method. Other common software packages are BLAST (1), and Phylip (30, 31; Phylogeny Inference Package, University of Washington). BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool, has recently been developed to simplify and automate bacterial identifications using DNA sequence Analysis. An excellent website that compares 194 of the phylogeny software packages and 16 free servers that are used in generating dendrograms. Using BLAST alone without phylogenetic data would not be appropriate to perform bacterial identification. This program combines similarity search tools in the sequence databases and phylogeny display programs. In this study, we amplified the16S rRNA gene sequence of the cellulose-producing acetic acid bacteria which were isolated from nature by using of universal primers. After sequencing, the unknown strain sequences were aligned with 16S rRNA gene sequence of all the bacteria which exist at GenBank by using of BIBI Database. The comparison of the 16S rRNA gene sequences and generating phylogenetic tree allows differentiation between organisms at the genus level across all major phyla of bacteria, in addition to classifying strains at multiple levels, including what we now call the species and subspecies level.

Key Words: 16S rRNA gene, universal primers, Bioinformatic software, BIBI Database, phylogenetic tree.