

منابع

- Abdoli, A. (2000) The inland water fishes of Iran. Naghsh Mana Publication, 378 pp, Tehran. (In Farsi)
- Adams, D.C., Rohlf, F.J. and Slice, D.E. (2004) Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'Revolution'. Italian Journal of Zoology 71: 5-16.
- Bagherian, A. and Rahmani, H. (2007) Morphological differentiation between two populations of the Shemaya, *Chalcalburnus chalcoides*: a geometrical morphometric approach. Zoology in the Middle East 40: 53-62.
- Bagherian, A. and Rahmani, H. (2009) Morphological discrimination between two populations of shemaya, *Chalcalburnus chalcoides* (Actinopterygii, Cyprinidae) using a truss network. Animal Biodiversity and Conservation 32: 1-8.
- Coad, B.W. (2016) Freshwater fishes of Iran. Updated 20 September 2016. [Cited 20 September 2016]. Available from: www.briancoad.com.
- Costa, C. and Cataudella, S. (2007) Relationship between shape and trophic ecology of selected species of Sparids of the Caprolace coastal lagoon (Central Tyrrhenian Sea). Environmental Biology of Fish 78: 115-123.
- DeAngelis, M.C. (2000) Data Modeling with ERwin, 1. Sams Publishing. New York.
- Eagderi, S., Esmailzadegan, E. and Maddah, A. (2013) Body shape variation in riffle minnows (*Alburnoides eichwaldii* De Filippii, 1863) populations of Caspian Sea basin. Taxonomy and Biosystematics 5(14): 1-8.
- Ergene, S. (1993) The growth rates of *Chalcalburnus mossulensis* (Heckel, 1843), (Pisces, Cyprinidae) in Karasu. Turkish Journal of Zoology 17(4): 367-377.
- Fisher, R. and Hogan, J.D. (2007) Morphological predictors of swimming speed: a case study of pre-settlement juvenile coral reef fishes. Journal of Experimental Biology 210: 2436-2443.
- Guill, J.M., Hood, C.S. and Heins, D.C. (2003) Body shape variation within and among three species of darters (Perciformes: Percidae). Ecology of Freshwater Fish 12: 134-140.
- Haas, T.C., Blum, M.J. and Heins, D.C. (2011) Morphological responses of a stream fish to water impoundment. Biology Letter 6: 803-806.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. and Ryan, P.D. (2001) Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4(4): 1-9.
- Hawkins, D.K. and Quinn, T.P. (1996) Critical swimming velocity and associated morphology of juvenile coastal cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*), steelhead trout (*O. mykiss*) and their hybrids. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53: 1487-1496.
- Hendry, A.P., Taylor E.B. and McPhail J.D. (2002) Adaptive divergence and the balance

- between selection and gene flow: lake and stream stickleback in the misty system. *Evolution* 56: 1199-1216.
- Langerhans, R.B., Layman, C.A., Langerhans, A.K. and Dewitt T.J. (2003) Habitat-associated morphological divergence in two neotropical fish species. *Biological journal of the Linnean Society* 80: 689-698.
- Langerhans, R.B. and Reznick, D. N. (2010) Ecology and evolution of swimming performance in fishes: predicting evolution with biomechanics. P200-248, In: Domenici, P., B.G Kapoor (eds.), *Fish locomotion: an ecoethological perspective*, Science Publishers Inc, 512 pp, Enfield.
- McGuigan, K., Franklin, C.E., Moritz, C. and Blows, M.W. (2003) Adaptation of rainbow fish to lake and stream habitats. *Evolution* 57: 104-118.
- Mohadasi, M., Shabanipour, N. and Eagderi, S. (2013) Habitat-associated morphological divergence in four Shemaya, *Alburnus chalcoides* (Actinopterygii: Cyprinidae) populations in the southern Caspian Sea using geometric morphometrics analysis. *International Journal of Aquatic Biology* 1: 82-92.
- Nacua, S.S., Dorado E.L., Torres M.A.J. and Demayo, C.G. (2010) Body shape variation between two populations of the white goby, *Glossogobius giuris*. *Research Journal of Fisheries and Hydrobiology* 5: 44-51.
- Nasri, M., Eagderi, S., Farahmand, H. and Hashemzade-SegharLoo, I. (2013) Body shape comparison of *Cyprinion macrostomum* (Heckel, 1843) and *Cyprinion watsoni* (Day, 1872) using geometric morphometric method. *International Journal of Aquatic Biology* 1(5): 240-244.
- Poulet, N., Berrebi, P., Crivelli, A. J., Lek, S. and Argillier C. (2004) Genetic and morphometric variations in the pikeperch (*Sander lucioperca* L.) of a fragmented delta. *Archive in Hydrobiology* 159: 531-554.
- Rahmani, H. and HassanzadehKiabi, B. (2005) Inter-population morphological variation of *Chalcalburnus chalcoides* (Gueldenstaedt, 1772) in Haraz and Gazafrood Rivers. *Environmental Science* 10: 21-33.
- Rahmani, H., Hassanzadeh Kiabi, B., Kamali, A. and Abdoli, A. (2007) Study of morphological characteristics of *Chalcalburnus chalcoides* (Gueldenstaedt, 1772) in Haraz and Shirood Rivers. *Journal of Agricultural and Natural Resources Science* 1-4.
- Robinson, B.W. and Wilson, D.S. (1994) Character release and displacement in fishes: a neglected literature. *American Nature* 144: 596-627.
- Rohlf, F.J. (2002) tpsSpline: Thin Plate Spline. State University of New York at Stony Brook. Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J. (2004) tpsUtil, file utility program. 1.47. Stony Brook, New York. State University

- of New York at Stony Brook.
- Rohlf, F.J. (2010) TpsDig2–Thin Plate Spline Digitise. 2.16. New York. State University of New York.
- Samaee, S.M. and Patzner, R.A. (2011) Morphometric differences among populations of Tu'inti, *Capoeta damascina* (Teleostei: Cyprinidae), in the interior basins of Iran. Journal of Applied Ichthyology 27(3): 928-933.
- Shafee, Z., Dorafshan, S., Keivany, Y. and Qasemi S.A. (2013) Genetic structure of Mosul bleak (*Alburnus mossulensis* Heckel, 1843) using microsatellite marker in Tigris basin. Taxonomy and Biosystematics 5(17): 9-22.
- Taravati, S. and Darvish J. (2010) GMTP: geometric morphometric tools package. 2.1. Iran
- Türkmen, M., and Akyurt, I. (2000) The population structure and growth properties of *Chalcalburnus mossulensis* (Heckel, 1843) caught from Aşkale region of River Karasu. Turkish Journal of Biology 24(1):95-111.
- Videler, J.J. (1993) Fish Swimming. Chapman and amp, Hall, 260 p.
- Vogel, S. (1994) Life in Moving Fluids: The Physical Biology of Flow 2. Princeton University Press. New Jersey.
- Vogel, S. (1994) Life in moving fluids, 2nd ed., Princeton University Press, Princeton. 484 p.
- Webb, P.W. (1984) Body Form, Locomotion and Foraging in Aquatic Vertebrates. American Zoologist 24(1): 107-120.
- Wootton, R.J. (1991) Ecology of teleost fishes. Springer, 212 pp, London.
- Yıldırım, A., Haliloğlu, H.I., Erdoğan, O., and Türkmen, M. (2007) Some reproduction characteristics of *Chalcalburnus mossulensis* (Heckel, 1843) inhabiting the Karasu River (Erzurum, Turkey). Turkish Journal of Zoology 31: 193-200.

بررسی تکنیک *PCR-DGGE* برای شناسایی گونه‌های مختلف *Candida*

آیدا حمیدخانی^۱، پریسا محمدی^{۲*}، عزت عسگرانی^۳، مریم یوسفی^۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۲/۰۱

تاریخ تصویب: ۹۵/۱۲/۱۶

چکیده

مخمر *Candida* از جمله شایعترین مخمرهای عفونت زای انسانی می‌باشد و در سال‌های اخیر نرخ عفونت‌های ایجاد شده توسط این مخمر افزایش یافته است. شناسایی زود هنگام *Candida* های بیماری زا نقش مهمی را برای انجام اقدامات درمانی و کنترل عفونت‌های بیمارستانی ایفا می‌نماید. روش‌های سنتی شناسایی *Candida* نسبت به روش‌های مولکولی از حساسیت کمتری برخوردار است و به زمان بیشتری نیاز دارند. با توجه به وجود برخی محدودیت‌ها در روش‌های مولکولی مورد استفاده، در این مطالعه امکان استفاده از تکنیک *PCR-DGGE* برای شناسایی ۵ گونه‌ی *Candida* بیماری زا یعنی، *C. glabrata*، *C. tropicalis*، *C. albicans*، *C. parapsilosis* و *C. orthopsilosis* ارزیابی شد. بدین منظور ناحیه‌ی *ITS2* با استفاده از پرایمرهای *GC-ITS3* و *ITS4* تکثیر شد و از محصولات به دست آمده در *DGGE* استفاده شد و نشان داده شد این تکنیک توانایی شناسایی و تفکیک گونه‌های مورد بررسی را دارا می‌باشد

واژه های کلیدی: مخمر، *PCR-DGGE*، *ITS2*، *Candida*.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

*۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران
(نویسنده مسئول: p.mohammadi@alzahra.ac.ir)

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

۴- کارشناس ارشد، آزمایشگاه ملی میکروبیولوژی، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

مقدمه

برای شروع درمان‌های ضد قارچی و یا سلول درمانی ضروری می‌باشد و به زنده ماندن بیمار کمک شایانی می‌نماید (Schabereiter-Gurtner et al., 2007). در حال حاضر شناسایی گونه‌های مختلف *Candida* در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و پزشکی با روش‌های استاندارد هم‌چون تشکیل لوله‌ی زیبا (Murray et al., 1995) و تست‌های بیوشیمیایی انجام می‌شود (Pfaller et al., 1993). روش‌های ذکر شده نیازمند خالص سازی ارگانیسیم‌های هدف و بسیار زمان برند. تست‌های فنوتیپی به دلیل تفاوت‌های موجود در سویه‌های مختلف مخمری و تغییرات زیاد فنوتیپی درون گونه‌ای، روش‌های مطمئنی برای شناسایی گونه‌های مختلف *Candida* نمی‌باشند. مشکل دیگر روش‌های سنتی تشخیص، عدم توانایی رشد بسیاری از اگزوتروف‌ها در محیط کشت‌های مورد نیاز برای انجام تست‌های مختلف می‌باشد (Ahearn et al., 1998).

روش‌های مولکولی نسبت به روش‌های سنتی راه کارهای دقیق‌تری را به منظور شناسایی میکروارگانیسیم‌ها فراهم می‌نمایند و از این روش‌ها به منظور شناسایی و طبقه بندی مخمرها نیز استفاده شده است. برخی از این تکنیک‌ها، PCR، real-time PCR، کاریو تایپینگ، پلی مورفیسیم هضم آنزیم محدود کننده (RFLP)، هیبریداسیون فلورسانس در محل

مخمرهای بیماری‌زای انسانی به فراوانی در محیط حضور دارند و برخی از آن‌ها فلور بدن انسان هستند. این مخمرها معمولاً فرصت طلب بوده و در زمانی که شرایط میزبان مساعد باشد سبب ایجاد عفونت‌های حاد و یا مزمن می‌شوند (Cone et al., 2004).

از جمله مخمرهای اصلی ایجاد کننده‌ی عفونت‌های انسانی می‌باشند. در دو دهه‌ی اخیر عفونت‌های بیمارستانی ایجاد شده با گونه‌های مختلف *Candida* تقریباً ده برابر افزایش یافته و نرخ مرگ و میر ناشی از کاندیدیاز تا ۸۰ درصد زیاد شده است (Wenzel, 1995). در حال حاضر *C. albicans* عامل ایجاد ۵۰ الی ۷۰ درصد از عفونت‌ها می‌باشد (Trofa et al., 2008). با این حال در ده سال اخیر عفونت‌های *C. albicans* نیز افزایش یافته است. از میان گونه‌های غیر از *C. albicans*، *C. parapsilosis*، *C. glabrata* و *C. krusei* و *C. tropicalis*، عامل ایجاد ۱۷/۱ درصد از عفونت‌های بیمارستانی می‌باشند (Tan et al., 2008). با توجه به افزایش عفونت‌های ایجاد شده توسط *Candida* و تفاوت در راه کارهای مقابله با گونه‌های مختلف، شناسایی دقیق گونه‌های *Candida* از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (Lopez-Martinez, 2010). شناسایی زود هنگام گونه‌های مختلف *Candida*

5.8srRNA و 28srRNA میباشند. ژن های RNA ریبوزومی توسط فاصله اندازهای ITS1 و ITS2 از هم جدا میشوند. نواحی ITS دارای نواحی متغیر و حفاظت شده میباشند و به همین دلیل به منظور شناسایی ژنتیکی قارچها استفاده میشوند (Reiss et al., 1998).

هدف از این مطالعه بررسی امکان استفاده از تکنیک PCR-DGGE با استفاده از ناحیهی ژنی ITS2 به منظور شناسایی گونه های مختلف *Candida* می باشد.

مواد و روشها

گونه های *Candida* و محیط کشت

لیست گونه های *Candida* مختلف مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ ذکر شده است. این گونه ها در محیط کشت (PDA potato dextrose agar) در دمای ۳۷ درجهی سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA مشابه روش زیانو^۱ و همکاران (Xiano, 2006)، دو لوپ باکتریولوژی (حدود ۲۰ میلی متر مکعب) از کلنی های تازه ی ۲۴ ساعته برداشته شد و به تیوپ ۱/۵ میلی لیتری حاوی ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژیکی منتقل گردید. عمل شستشوی سلولی دوبار با استفاده از سانتریفیوژ (Hettich Rotina 380R) در دور $\times 36894$ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب

(FISH) و روش تعیین توالی میباشند (Dassanayake & Samaranayake) 2003, Moter & Gobel 2000, Trtkova 2006, Raclavsky 2006). با استفاده از روش PCR به همراه تکنیک الکتروفورز با ژل دارای شیب دنا توره کننده (DGGE) امکان شناسایی گونه های پیش بینی نشده و حداقل وجود دارد. تکنیک DGGE یکی از پرکاربردترین روش های غیر وابسته به کشت به منظور مطالعهی ساختار جمعیت های میکروبی می باشد (Muyzer 1998). در این روش ابتدا با استفاده از PCR محصولاتی از ناحیهی ژن مورد بررسی به دست آمده و سپس از آن ها در DGGE استفاده می شود. DGGE قادر است بر اساس تفاوت های موجود در ترکیب توالی های مورد بررسی و اثری که این تفاوت ها بر روی رفتارهای ذوب قطعات می گذارند، گونه های مختلف را شناسایی نماید. بدین صورت که ذوب شدن جزئی قطعات DNA در ژل اکریل امید دارای شیب دنا توره کننده، در طی الکتروفورز موجب توقف حرکت آن ها در ژل و تفکیک توالی های متفاوت از هم و در پی آن سبب شناسایی گونه های مختلف می شود (Muyzer et al., 1993).

ژن های RNA ریبوزومی در ژنوم هاپلوئید تمامی قارچها با آرایش پشت سر هم و تکرار ۵۰ تا ۱۰۰ عدد وجود دارند. این تکرارها شامل ژنهای 18srRNA،

حاصله ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز شامل ۱۰ میلی مولار Tris-HCl، ۱ میلی مولار EDTA، ۰/۵ میلی مولار NaCl، ۳۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) و حدود ۲۰۰ میکرولیتر گلوله‌ی شیشه‌ای به قطر یک میلی متر اضافه گردید و عمل ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه روی آن انجام شد. سپس محلول به مدت ۵ دقیقه در دور $g \times 36894$ سانتریفیوژ شد و مایع رویی به تیوپ جدیدی منتقل و حجم مساوی از ترکیب فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل به آن اضافه شد. پس از سانتریفیوژ مجدد و انتقال فاز رویی به تیوپ جدید، اتانول مطلق سرد با حجمی ۳ برابر مایع رویی به آن افزوده شد و

به مدت ۱ ساعت در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. محلول به مدت ۲ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با دور $g \times 44272$ سانتریفیوژ شد و پس از شستشوی رسوب حاصله با اتانول ۷۰ سرد، عمل سانتریفیوژ به مدت ۲ دقیقه با دور $g \times 44272$ در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام گرفت. در نهایت رسوب حاصله در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید و تا موقع استفاده در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شد. به منظور اطمینان از کیفیت DNA به دست آمده میزان جذب نوری با استفاده از نانودراپ (Thermo Scientific 2000C) خوانده شد.

جدول ۱: گونه‌های مختلف *Candida* مورد بررسی در این مطالعه

کد گونه	گونه
CCUG ^۲ ۳۲۷۲۳	<i>C. albicans</i>
CCUG ۳۵۲۶۷	<i>C. glabrata</i>
ATCC ۲۲۰۱۹	<i>C. parapsilosis</i>
CCUG ۳۴۲۷۴	<i>C. tropicalis</i>

شرایط PCR

PCR با دستگاه ترموسایکلر (96 PeqSTAR Universal Gradient) انجام شد و قطعات حدود ۳۰۰ جفت بازی در ناحیه‌ی ITS2 با استفاده از پرایمرهای ITS3 و ITS4 تکثیر یافت (White et al., 1990). به منظور جلوگیری از ذوب شدن کامل قطعات DNA در DGGE، قطعه‌ی کوتاهی از GC با توالی 5'CGCCCGCCGCGCGCGGGG3' به انتهای 5' پرایمر رفت متصل گردید (Muyzer, 1990). مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR به همراه ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار از چهار نوع نوکلئوتید (dNTP)، ۰/۱۶ میلی مولار از هر کدام از پرایمرهای رفت ITS3-GC و برگشت ITS4، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq polymerase و ۱ میکرولیتر DNA الگو بود. برنامه‌ی اجرا شده در PCR عبارت بود از: دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه به منظور دناتوراسیون اولیه، ۳۵ سیکل شامل دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۸ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه. پس از انجام PCR به منظور اطمینان از کیفیت محصولات به دست آمده ۵ میکرولیتر از هر کدام از محصولات بر روی ژل آگارز ۱ درصد با

ولتاژ ۷۰ ولت بررسی شد.

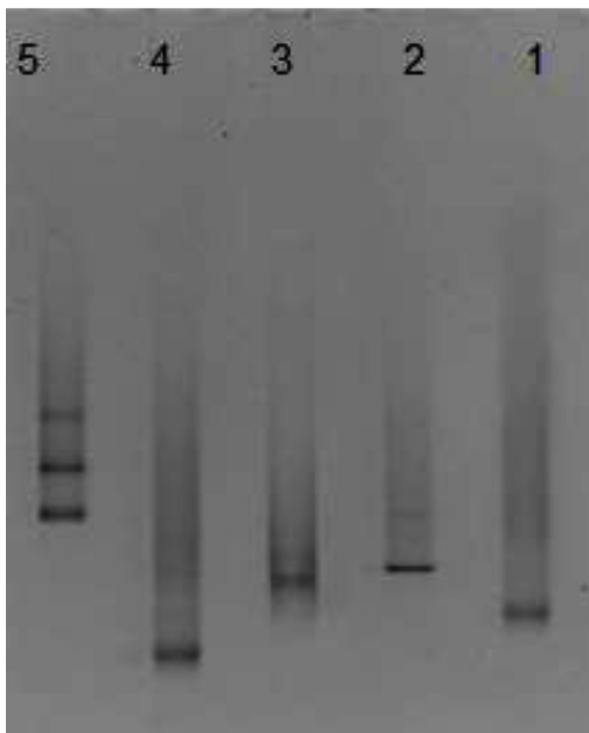
شرایط DGGE

آنالیز DGGE با استفاده از سیستم (Bio-Rad Dcode universal mutation detection system) انجام گرفت. الکتروفورز در ژل اکریل آمید ۸ درصدی شامل شیب دناتوره کننده‌ی اوره و فرم آمید ۳۲/۵ تا ۵۷/۵ درصد انجام شد و ژل با استفاده از بافر 1X TAE در ولتاژ ۵۵ ولت و دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی گراد برای مدت ۱۲ ساعت الکتروفورز گردید. ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۲۰ میکرولیتر رنگ بارگذاری 2x مخلوط گردید و در الکتروفورز استفاده شد. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در بافر 1X TAE رنگ زدایی گردید. در نهایت ژل با استفاده از ژل داگ (Syngene In Genius LHR2) مشاهده و از آن عکس برداری شد.

نتایج

با استفاده از روش استخراج DNA فنل کلروفرم و گلوله‌های شیشه‌ای مقدار زیادی (حدود ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) DNA خالص و قابل تکثیر از گونه‌های مختلف *Candida* به دست آمد. پس از تکثیر DNA، از محصولات PCR (حدود ۲۰ میکرولیتر) در DGGE استفاده شد. به منظور بهینه سازی تفکیک باندهای متعلق به گونه‌های مختلف از یکدیگر و وضوح باندها، شرایط مختلفی

برای الکتروفورز اعمال گردید و شیب‌های دناتوره کننده‌ی اوره و فرم آمید متفاوتی به کار گرفته شد. در نهایت شرایط شیب ۳۲/۵ تا ۵۷/۵ درصد در ژل ۸ درصد اکریل آمید در ولتاژ ۵۵ ولت و دمای ۵۶ درجه ی سانتی گراد برای مدت ۱۲ ساعت به عنوان بهترین شرایط، DGGE انتخاب گردید و مشاهده شد باندهای متعلق به گونه‌های مختلف *Candida* در این شرایط به خوبی از هم تفکیک می‌شوند (شکل ۱).



شکل ۱: شکل الکتروفورز PCR-DGGE گونه‌های مختلف *Candida* در ژل اکریل آمید ۸ درصد. به ترتیب ردیف ۱ تا ۵ نشان دهنده‌ی *C. orthopsilosis*، *C. parapsilosis*، *C. glabrata* و *C. tropicalis* و *C. albicans* می‌باشد.

تفاوت‌های موجود میان گونه‌های مختلف نزدیک به هم در مقایسه با نواحی حفاظت شده‌ی رمزگذار rRNA بیشتر باشد. در نتیجه توالی DNA در ناحیه‌ی ITS معمولاً برای طبقه بندی تاکسونومیکی مناسب تر می‌باشد (Lord et al., 2002). از این رو در این مطالعه از ناحیه‌ی ITS2 به منظور شناسایی گونه‌های مختلف *Candida* توسط DGGE استفاده شد.

بحث

شناسایی مولکولی گونه‌های مختلف قارچی معمولاً با استفاده از نواحی ITS صورت می‌پذیرد. ناحیه‌ی غیر رمزگذار ITS که شامل ITS1، 5.8S rDNA و ITS2 می‌باشد، به دلیل وجود تعداد تکرارهای زیاد در ژنوم قارچ‌ها، هدف مناسبی برای PCR است. این ناحیه دارای سرعت تکامل بالایی می‌باشد و سبب می‌شود

که در برخی از گونه‌های قارچی مطالعه شده با DGGE چندین باند در ژل برای یک میکروارگانیزم خاص ایجاد شد. پرایمرهای NL1 و LS2 بخش زیادی از دومین ناحیه‌ی D1 (26S rRNA) (Cocolin et al., 2003) و پرایمرهای ITS3 و ITS4 ناحیه‌ی ITS2 و بخشی از 5.8S rRNA از ژن RNA ریبوزومی را تکثیر می‌دهند (White et al., 1990) و از آن جایی که ITS2 دارای تکرارهای زیادی می‌باشد، گمان می‌رود باندهای اضافی حاصله از تکثیر با استفاده از پرایمرهای ITS3 و ITS4 برای گونه‌ی *C. tropicalis* به دلیل وجود تنوع ژنتیکی در کپی‌های مختلف ناحیه‌ی بررسی شده در ناحیه‌ی ITS2 باشد (Schoch et al., 2012).

به دلیل شیوع بالا و گسترش روز افزون عفونت‌های ایجاد شده توسط گونه‌های مختلف *Candida* (Lopez-Martinez, 2010) تکنیک DDGE می‌تواند نقش به‌سزایی را در شناسایی عوامل عفونت زای کاندیدیایی ایفا نماید. تکنیک DGGE روشی سریع، قابل اعتماد، تکرار پذیر و مقرون به صرفه برای شناسایی میکروارگانیزم‌ها بوده (Muyzer, 1999) و با استفاده از این تکنیک می‌توان گونه‌های غیر قابل انتظار و با فراوانی پایین را در محیط مورد بررسی شناسایی نمود (Weerasekera et al., 2013). از این رو ارزیابی امکان استفاده از DGGE به منظور شناسایی

با توجه به شکل ۱ مشاهده می‌شود بهینه‌سازی شرایط DGGE سبب شد تا قطعات تکثیر شده‌ی ناحیه‌ی ITS2 از ۵ گونه‌ی مختلف میزان حرکت متفاوتی را در ژل DGGE از خود نشان دهند. به طوری که *C. albicans* و *C. tropicalis* به ترتیب در کمترین و بیشترین غلظت از ماده‌ی دنا توره کننده در ژل متوقف شده و سایر گونه‌ها در فاصله‌ی میانی آن‌ها قرار گرفتند. در مطالعه‌ی ای که توسط ویراسکرا^۱ و همکاران در سال ۲۰۱۳ روی گونه‌های مختلف *Candida* بزاق صورت گرفت (Weerasekera et al., 2013)، نشان داده شد امکان شناسایی گونه‌های مختلف *Candida* با استفاده از پرایمرهای NL1 و LS2 توسط DGGE وجود دارد و هر یک از گونه‌های *Candida* یک باند خاص در جایگاه خاصی از ژل را به خود اختصاص می‌دهند. در مطالعه‌ی حاضر با وجود این که برای هر کدام از گونه‌های *C. albicans*، *C. orthopsilosis*، *C. glabrata* و *C. parapsilosis* یک باند در ژل به دست آمد، اما گونه‌ی *C. tropicalis* 4 باند ایجاد نمود. در مطالعه‌ی ای که توسط میکایلسن^۲ و همکاران بر روی کلنی‌های قارچ‌های کاغذ انجام شده بود نیز نتایج مشابهی برای محصولات PCR حاصل شده با پرایمرهای ITS3 و ITS4 مشاهده شد (Michaelsen et al., 2006). به طوری

1. Weerasekera

2. Michaelsen

سایر گونه‌های بیماری‌زای *Candida* با نواحی ژنی مختلف می‌تواند نقش مؤثری در افزایش کاربردهای تشخیصی این روش ایفا نماید. نتایج‌گیری در این مطالعه امکان استفاده از تکنیک DGGE به منظور شناسایی ۵ گونه‌ی مختلف بیماری‌زای *Candida* مورد

بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که با استفاده از این تکنیک امکان تفکیک و شناسایی گونه‌های مختلف بیماری‌زای *Candida* با استفاده از قطعات DNA تکثیر یافته از ناحیه‌ی ITS2 وجود دارد و الگوی خاصی از باندها حاصل می‌شود که می‌توان از آن در تشخیص گونه‌های مسبب عفونت‌های کاندیدیایی بهره برد.

منابع

- Ahearn, D.G. (1998) Yeasts pathogenic for humans. Pp. 9–14. In: C. P. Kurtzman and J. W. Fell (eds), *The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed. Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands.
- Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A. (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189(1): 81–87.
- Cone, L.A., Byrd, R.G., Potts, B.E., Wuesthoff, M. (2004) Diagnosis and treatment of *Candida* vertebral osteomyelitis: clinical experience with a short course therapy of amphotericin B lipid complex. *Surgical Neurology* 62(3): 234-7.
- Dassanayake, R.S., Samaranyake, L.P. (2003) Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting: the basics. *Methods Molecular Biology* 226: 117-22.
- Lopez-Martinez, R. (2010) Candidosis, a new challenge. *Clinics in Dermatology* 28(2):178-84.
- Moter, A., Gobel, U.B. (2000) Fluorescence in situ Hybridization (FISH) of microorganisms for direct visualization. *Journal of Microbiological Methods* 41(2):85-112.
- Lord, N.S., Kaplan, C.W., Shank, P., Kitts, C.L., Elrod, S.L. (2002) Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *FEMS Microbiology Ecology* 42(3): 327-37.
- Michaelsen, A., Pinzari, F., Ripka, K., Lubitz, W., Pilar, G. (2006) Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58(3): 133-141.
- Murray, P.R., Baron, E, Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (1995) *Manual of clinical microbiology*, 6th ed., ASM Press. 436pp, Washington DC.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reac-