

دارای رتبه علمی-پژوهشی از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

معرفی یک نسخه ساده از روش Van Erth در مطالعه SNP typing باسیلوس آنتراسیس سازگار با ماشین های ترموسایکلر معمولی

چکیده

در ژنوتایپینگ باسیلوس آنتراسیس، *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)* typing یکی از روش های شناخته شده بین المللی می باشد. در روش استاندارد Van Erth موجودیت SNPs در ۱۳ منطقه از ژنوم باکتری مورد بررسی قرار می گیرد. با هدف تسهیل روش پیشنهادی Van Erth و سازگار نمودن آن برای استفاده در آزمایشگاه های با بودجه محدود ۱۳ زوج پرایمر متناسب با ۱۳ لوکوس SNP طراحی شدند. علاوه بر این یک پروتکل واحد از نظر دما و اجزاء PCR تهیه و تکمیل گردید که تکثیر همزمان همه لوکوس ها توسط ماشین های ترموسایکلر کلاسیک را به سادگی امکان پذیر نمود. کارایی این روش در عمل از طریق اعمال موفقیت آمیز آن بر روی ۹ جدایه باسیلوس آنتراسیس نشان داده شد. ما صرفه به عنوان جایگزین روش پیشنهادی Van Erth توصیه می نمایم.

واژه های کلیدی: باسیلوس آنتراسیس، ژنوتایپینگ، PCR، SNPs

زهرا نجفی علیا

دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

کیوان تدین

استادیار میکروب شناسی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

رایناک قادری

دکترای میکروب شناسی دامپزشکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

نویسنده مسئول: کیوان تدین

پست الکترونیک: k.tadayon@rvsri.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۲۴۹۶۸۹۰۷

آدرس: مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

دریافت: ۹۳/۳/۱

ویرایش پایانی: ۹۳/۳/۱۹

پذیرش: ۹۳/۳/۲۱

آدرس مقاله

نجفی علیا ز، تدین ک، قادری ر " معرفی یک نسخه ساده از روش Van Erth در مطالعه SNP typing باسیلوس آنتراسیس سازگار با ماشین های ترموسایکلر معمولی " مجله علوم آزمایشگاهی، فروردین و اردیبهشت ۹۴، دوره نهم (شماره ۱): ۹۷-۱۰۳

مقدمه

بر اساس برآوردهای رسمی موجود تعداد موارد انسانی آنتراکس در مقیاس جهانی بین ۲ تا ۲۰ هزار مورد در هر سال تغییر می نماید (۱). در سال های اخیر با توجه به اهمیت جهانی آنتراکس مطالعات دامنه دار و گسترده ای در ارتباط با اپیدمیولوژی *باسیلوس آنتراسیس* با استفاده از روش های ملکولی نظیر *multiple-locus variable-number tandem Single Nucleotide analysis (MLVA)* و *Polymorphism (SNP) Typing* صورت پذیرفته است. بر همین اساس اکنون توالی ژنتیکی کامل بیش از ۷ سویه *باسیلوس آنتراسیس* و از جمله سویه واکسینال *Bacillus anthracis Sterne 34F2* و همچنین سویه حاد *B. anthracis Ames* در دسترس می باشد. توسعه و تکمیل روش های ملکولار ژنوتایپینگ *باسیلوس آنتراسیس* زمینه گشایش افق های تازه ای را در شناخت درست اپیدمیولوژی آنتراکس فراهم نموده است که پیش از این دستیابی به آنها امکان پذیر نبوده است. پیش از این کاربرد روش استاندارد ژنوتایپینگ *MLVA* با استفاده از ۸ لوکوس (*vrnA, vrnB1, vrnB2, vrnC1, vrnC2, CG3, pxO1-aat, pxO2-at*) توسط مؤذنی جولای بر روی مجموعه ای از ۱۶ جدایه ایرانی *باسیلوس آنتراسیس* همراه با سویه خارجی واکسینال *Bacillus anthracis Sterne 34F2* وجود ۷ تیپ ژنتیکی را در ایران نشان داده است (تدین، اطلاعات منتشر نشده). در حال حاضر ساختار ژنتیکی *باسیلوس آنتراسیس* های موجود در این آرشیو میکروبی با استفاده از روش *SNP Typing* در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در حال بررسی تکمیلی می باشد. در این روش تایپینگ که در اساس توسط *van Erth* در سال ۲۰۰۷ ابداع و تکمیل گردید تعداد ۱۳ لوکوس ژنتیکی از ژنوم *باسیلوس آنتراسیس* که دارای نقاط *SNP* به نام های مشخصه *A.Br.001, A.Br.002, A.Br.003, A.Br.004, A.Br.006, A.Br.007, A.Br.008, A.Br.009, B.Br.001, B.Br.002, B.Br.003, B.Br.004, A/B.Br.001* می باشند، انتخاب و نوکلئوتید مشخص در هر *SNP* به روش تعیین توالی شناسایی می گردد (۱). در نهایت با تجمیع یافته های مربوط به ۱۳ لوکوس در هر جدایه/سویه تیپ ژنتیکی *SNP* تعیین می

گردد. در روش پیشنهادی *van Erth* پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ۱۳ لوکوس به گونه ای طراحی شده اند که اندازه قطعات حاصل از انجام تکثیر کوچک تر از ۱۰۰ زوج باز می باشد (جدول ۱). جداسازی و تخلیص اینگونه قطعات پس از تکثیر و همچنین تعیین توالی نوکلئوتیدی آن ها با ماشین های متعارف تعیین توالی معمولاً با اشکال همراه می باشد. علاوه بر این، روش *van Erth* با استفاده از تجهیزات و تکنیک های پرهزینه نظیر تعیین توالی نوکلئوتیدی به روش اسپکترومتری جرمی توسط محققین مختلف انجام پذیرفته است که دسترسی به این تجهیزات در توان آزمایشگاه های تحقیقاتی کشورهای در حال توسعه نمی باشد. در مطالعه حاضر چگونگی اعمال تغییرات تکنیکی شرح داده می شود که با استفاده از آن ها می توان تمام ۱۳ لوکوس معرفی شده *van Erth* را با استفاده از روش *PCR* کلاسیک و به کارگیری یک روش کار واحد به گونه ای تکثیر نمود که محصولات به دست آمده آماده انجام آزمون تعیین توالی باشند.

روش بررسی

علاوه بر سویه واکسینال *Bacillus anthracis Sterne 34F2* که به عنوان سویه استاندارد برای اجرای آزمون در نظر گرفته شد تعداد ۱۲ جدایه *باسیلوس آنتراسیس* جمع آوری شده از خاک مراتع و همچنین دامداری های مناطق مختلف ایران و همچنین موارد بیماری در انسان و دام موجود در آرشیو میکروبی مؤسسه رازی به منظور ارزیابی کارایی یافته های مطالعه مورد تحقیق قرار گرفتند. این جدایه ها پیش از این به روش های استاندارد میکروبیولوژیکی، بیوشیمیایی و همچنین ملکولی از نظر هویت مورد بررسی قرار گرفته و موجودیت آن ها به عنوان *باسیلوس آنتراسیس* تأیید گردید. کشت باکتری: برای کشت باکتری در مورد سویه واکسینال، یک بطری واکسن زنده شاربن ساخت مؤسسه رازی بخوبی تکان داده شد و سپس در شرایط سترون ۱ میلی لیتر از محتویات آن بر روی یک پلیت (به قطر ۱۰ سانتیمتر) محیط مغذی آگار خوندار به گونه ای کشت داده شد که تمام سطح پلیت تلقیح گردد. ظرف کشت سپس به گرمخانه انتقال و به مدت ۱۵ ساعت در دمای 37°C نگهداری گردید.

گردید. آزمون های ملکولی از کیت تجارتي آمپلیکون از محصولات شرکت آمپلیکور (Ampliquor[®], Denmark) برای اجرای تمام آزمون های PCR استفاده شد. این کیت محتوی آنزیم تک پلی مراز، نوکلئوتیدهای چهارگانه، کلرید منیزیم و سایر املاح متعارف مورد نیاز برای PCR می باشد. برای هر لوکوس چهار برنامه تنظیم گردید به گونه ای که هر برنامه شامل ۶ واکنش PCR مترادف با ۶ دمای مختلف annealing (۵۵، ۵۶/۷، ۵۹/۱، ۶۰/۴، ۶۲/۹، و ۶۴/۹ درجه سانتیگراد) اجرا گردید. علاوه بر این در دو آزمون میزان پرایمر مصرفی (مقادیر ۱ و یا ۵ پیکومول) و در دو آزمون دیگر میزان کلرید منیزیم (۱ mM یا ۲ mM) به عنوان متغیر اعمال گردید. پرایمرهای طراحی شده توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen[®], Korea) ساخته شدند. تهیه و آماده سازی واکنش های PCR به صورت master mix صورت پذیرفت. حجم اجزاء تمام واکنش ها در تمام آزمون ها به ترتیبی تنظیم گردیدند که حجم نهایی هر واکنش برابر با ۱۲ μL تنظیم شد (جدول ۲). به عنوان کنترل منفی از Double Distilled PCR water, PCR master mix with no DNA template حسب نیاز استفاده گردید. برای الکتروفورز محصولات PCR از ژل ۱/۵ درصد آگاروز از درجه مولکولار بیولوژی (Invitrogen[®], USA) از پیش رنگ شده با Red Safe استفاده شد. پس از بارگذاری، ژل ها در میدان الکتریکی به مدت ۲ ساعت در میدان الکتریکی به قدرت ۲ V/cm رانده و سپس در دستگاه ژل داک (BioRad[®], USA) مورد تصویر برداری قرار گرفتند. با مقایسه باندهای مشاهده شده هر لوکوس با باندهای DNA size marker استاندارد 100 bp (Invitrogen[®], USA) اندازه تقریبی محصولات PCR مشخص گردید. نتایج تصویری مربوط به آزمون های چهارگانه هر لوکوس به صورت مستقل و یافته های تمام ۱۳ لوکوس به صورت تجمیعی مورد بازبینی قرار گرفتند و یک برنامه واحد قابل اجرا از نظر دما و غلظت اجزاء مهم متغیر سازنده (منیزیم کلراید و پرایمرها) برای همه لوکوس ها تنظیم گردید (جدول ۲). از این برنامه واحد برای تکثیر هر ۱۳ لوکوس ژنوم سویه واکسینال *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 و علاوه بر آن تعداد ۱۲ جدایه حاد *Bacillus*

در مورد جدایه های حاد *Bacillus anthracis* از روش مشابه سویه واکسینال استفاده گردید با این تفاوت که به جای بطری واکسن از میکروفیوژهای محتوی سوسپانسیون باکتری در سرم فیزیولوژی استفاده گردید و تحت شرایط استریل پس از هم زدن محتویات، یک لوپ یکبار مصرف (10 μl) به سوسپانسیون باکتری آغشته و از آن برای تلقیح پلیت آگار خوندار استفاده شد. استخراج ژنوم باکتری به روش جوشانیدن انجام گردید. به همین منظور معادل یک لوپ کامل از کشت ۱۴ ساعته باکتری برداشت و به 400 μl بافر تجارتي TB-lysis در یک میکروتیوب انتقال داده شد. به کمک یک وزنه فلزی مناسب میکروتیوب در کف محفظه یک بن ماری محتوی آب در حال جوش (۹۶ °C) قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در همین وضعیت نگه داشته شد تا باکتری های انتقال داده شده در فرم رویشی بطور کامل غیر فعال گردند. در مرحله بعد میکروتیوب در ۹۷۵۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع شناور سطحی محتوی ژنوم باکتری از فیلتر سرسنگی ۰/۲ میکرولیتر عبور داده شد. میزان ۱۱۰ از سوسپانسیون به دست آمده بر روی یک پلیت محیط مغذی آگار خوندار کشت و به کمک لوپ یکبار مصرف تمام سطح محیط کشت تلقیح گردید. ظرف کشت به گرمخانه ۳۷ °C انتقال و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و از نظر وجود هر نوع نشانه مبتنی بر رشد احتمالی *Bacillus anthracis* مورد توجه قرار گرفت. سوسپانسیون های محتوی ژنوم استخراج شده باکتری پس از اطمینان از غیر فعال شدن کامل همه باسیل های شاربن تا زمان مصرف در یخچال شدند.

طراحی پرایمر: ژنوم کامل سویه *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 (قابل دسترسی از) با استفاده از برنامه Artemis (۱۰) مورد جستجو قرار گرفت و موقعیت مکانی تمام ۱۳ لوکوس معرفی شده توسط van Erth بر اساس پرایمرهای پیشنهاد شده مکان یابی گردید. حدود 2Kb از ژنوم باکتری در محدوده هر لوکوس به گونه های انتخاب گردید که لوکوس مورد نظر تقریباً در میانه قرار داشته باشد. طراحی پرایمر برای هر لوکوس به صورت مستقل با استفاده از برنامه Primer 3 (۱۲،۱۱) صورت پذیرفت و در تنظیمات برنامه، اندازه محصول PCR در محدوده ۷۰۰-۴۵۰ زوج باز تعریف

تعیین گردید. نتایج با استفاده از نرم افزارهای Clustal (۱۳) و Chromas پردازش و همخوانی آنها با مناطق هم ارز از ژنوم معرفتی شده *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 مقایسه گردید.

anthracis موجود در آرشیو میکروبی موسسه رازی استفاده شد. به منظور اطمینان از درستی عملکرد برنامه به دست آمده توالی نوکلئوتیدهای محصولات آمپلی فیکاسیون مربوط به هر ۱۳ لوکوس توسط آزمایشگاه شرکت ماکروژن کره جنوبی

جدول ۱- لوکوس ها و پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق و همچنین مطالعه Van Erth. طول محصولات حاصل از آمپلی فیکاسیون هر لوکوس (در مقیاس زوج باز) و موقعیت مکانی آنها بر اساس ژنوم *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 مشخص گردیده است.

نام لوکوس	پرایمر (5'-3') مورد استفاده در مطالعه Van Erth	اندازه محصول PCR (زوج باز) (موقعیت مکانی)	پرایمر (5'-3') مورد استفاده در مطالعه حاضر	اندازه محصول PCR (زوج باز) (موقعیت مکانی)
A.Br.001	f) CAA GCG GAA CCA AAT TTA ATC TTT	۸۹ (-۱۸۲۱۵۷)	f) TTA CAG TGC CGC CAA AGA CA	۶۰۸ (-۱۸۲۳۸۰)
A.Br.002	r) TTC ACC GTA CGT CAT f) AAC GAT ACC TAA AAT CGA TAA AG	۲۶ (-۹۴۷۶۶۸)	r) CCC ACT CAG TCG f) TAG AGA TGT GGT CGC GAA GT	۶۶۹ (-۹۴۷۹۷۵)
A.Br.003	r) GGC AGA AGG AGC AAG f) GCT ACT GTC ATT GTA TAA AAA CCT CCT TT	۹۴۷۶۴۲ ۵۵ (-۱۴۹۳۲۴۳)	r) AGC TTC AAA GAG TCC f) TCG TCA AGG AAT CGG ACG TT	۹۴۷۳۰۶ ۶۱۴ (-۱۴۹۳۶۳۴)
A.Br.004	r) CGC TTG CCA AGC TTT TTT f) CCG ATA CCA GTA AAC GAC GAC AT	۱۴۹۳۱۸۸ ۷۵ (-۳۶۰۱۳۹۲)	r) CGA GCT TCT TCC CAC f) AAT AAG TGG CGC TGC CGT AT	۱۴۹۳۰۲۰ ۵۵۷ (-۳۶۰۱۵۸۲)
A.Br.006	r) CTG GAA TTG GTG GAG f) CCG GAA ATT GCT ATT AGA ACG AA	۳۶۰۱۳۱۷ ۱۳۶ (-۱۶۲۵۴۹)	r) CAG ATG GAT CGC GTT f) ATG GAT GAA AAT GAT CAG CCG C	۳۶۰۱۰۲۵ ۵۱۳ (-۱۶۲۷۴۹)
A.Br.007	r) TCC CAA TCT AGC GTT f) TTG GTA ACG AGA CGA TAA ACT GAA TAA	۱۶۲۴۱۳ ۵۸ (-۲۶۶۴۶۴)	r) CAG CAA TCT CCC CTT f) TAG TAC CGC AAG CGG AAG AG	۱۶۲۲۳۶ ۵۴۰ (-۲۶۶۳۳۲)
A.Br.008	r) GCC TTG GAT TGG CGA TTC GCA ACT ACG CTA TAC GTT TTA GAT	۲۶۶۴۰۶ ۲۸ (-۳۹۴۷۷۶۲)	r) TGT CAT CGG CGA CTT f) CGC CAA ACG ATG CAA ACT CA	۲۶۶۰۹۲ ۴۵۸ (-۳۹۴۷۹۲۷)
A.Br.009	r) ACC ATC GAT TGG CTG f) GGC AAT CGG CCA CTG TTT GGG TTT CTA CTG TGTA TGT TGT TAA TAA AAA	۳۹۴۷۷۳۴ ۱۰۰ (-۲۵۹۰۳۵۳)	r) ACC ATC GAT TGG CTG f) TCC CCT AAT GGA ATA CGC GG	۳۹۴۷۴۶۹ ۵۴۵ (-۲۵۹۰۵۷۹)
B.Br.001	r) GCG CTT CGA ATT GGT f) TGC ATG CTT CTT CTA ACA GAG TAG TTA AT	۲۵۹۰۲۵۳ ۴۹ (-۱۴۵۵۳۸۸)	r) GCG CTT CGA ATT GGT f) GTT CTG GTG CTG CAT TTG GTA	۲۵۹۰۰۳۴ ۵۹۹ (-۱۴۵۵۵۰۴)
B.Br.002	r) ACG CTT CAT CCG TAA f) TGT TGC ACC TTC TGT GTT CGT T	۱۴۵۵۳۳۹ ۳۶ (-۱۰۵۶۶۴۶)	r) ACG CTT CAT CCG TAA f) AAC GAA GGG GAC AGT GGA AG	۱۴۵۵۰۵۵ ۶۱۰ (-۱۰۵۶۸۸۴)
B.Br.003	r) GTA GTG GCT TCA CCG f) CAT TTA TTC GCA TAG AAG CAG ATG A	۱۰۵۶۶۱۰ ۸۸ (-۱۴۹۴۳۹۴)	r) TCC CGT TGT AAG f) TTT CCG TAT GGC TGT GTT TGG	۱۰۵۶۲۷۴ ۴۷۹ (-۱۴۹۴۵۱۶)
B.Br.004	r) TGT GCC ATC AAA TAA CTC f) GAA GTT AAG TAT CAA CCA GCA GAA GAA A	۱۴۹۴۳۰۶ ۱۲۱ (-۷۰۰۱۶)	r) CCA AAT GAA CCA CCA f) GTT TAT GCC GTG AGA GGA GGT	۱۴۹۴۰۳۷ ۶۱۹ (-۷۰۱۹۷)
A/B.Br.001	r) CCG CCG CCT GAG CTT f) GAA GGT CTC CAA TTT GGA TTT AAA AT	۶۹۸۹۵ ۱۲۰ (-۳۶۹۸۶۳۴)	r) AAC ACC CTT CGG AAT f) TGG GCG TCG TTA CAA CTT CT	۶۹۵۷۸ ۵۹۹ (-۳۶۹۸۷۷۰)
	r) CGT GTG AAC CTT TCG GTA AAT AGT C	۳۶۹۸۵۱۴	r) CCA GCA AGC GAT ATA CCG GA	۳۶۹۸۲۰۰

جدول ۲- اجزاء سازنده و برنامه دماهای مورد استفاده در پروتکل های PCR مورد استفاده در این تحقیق

PCR protocol	PCR master mix (μl)	Primer forward ¹ (μl)	Primer reverse ¹ (μl)	MgCl ₂ ² (μl)	DNA template (μl)	PCR water (μl)	Total volume (μl)
۱	۶	۰/۷۵	۰/۷۵	۰	۲	۲/۵	۱۲
۲	۶	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۳۶	۲	۲/۱۴	۱۲
۳	۶	۰/۱۵	۰/۱۵	۰	۲	۳/۷	۱۲
۴	۶	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۳۶	۲	۳/۳۴	۱۲
Universal	۶	۰/۲	۰/۲	۰	۱/۵	۴/۱	۱۲

جدول ۲- اجزاء سازنده و برنامه دماهای مورد استفاده در پروتکل های PCR مورد استفاده در این تحقیق.

PCR protocol	Initial Denaturation s/°C	Number of cycles	Denaturation s/°C	Annealing s/°C	Extension s/°C	Final Elongation s/°C
Universal	۳۰۰/۹۵	۳۵	۳۰/۹۵	۴۵/۶۵	۴۵/۷۲	۶۰۰/۷۲

1) From 25 mM stock solution

2) From 5 pmol/ μl stock solution

یافته ها

تروریستی، بر اهمیت شناخت درست از اپیدمیولوژی و تنوع ژنتیکی این باکتری می افزاید. در جریان استخراج ماده ژنتیکی باسیلوس آنتراسیس در مطالعه حاضر پس از غیر فعال نمودن باکتری توسط حرارت سوسپانسیون به دست آمده از فیلتر ۰/۲ گذرانیده شد تا هرگونه احتمال بقاء باکتری در شکل هاگ از بین برده شود. تجربه آزمایشگاهی مؤلفین ضرورت انجام این اقدام احتیاطی را از نظر ایمنی کاربران تأیید می نماید اگرچه ضرورت و اهمیت انجام این عمل در برخی از موارد کمتر مورد توجه محققین قرار گرفته است (۱۴). طراحی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق به گونه ای صورت پذیرفته است که اندازه تمام قطعات مورد انتظار در محدوده ۷۰۰-۴۵۰ زوج باز می باشد که بدین ترتیب شناسایی آنها در جریان ژل الکتروفورز را آسان تر می نماید. یکی از شاخص ترین یافته های کاربردی این تحقیق توانایی توسعه یک برنامه واحد PCR می باشد که هم از نظر اجزاء و هم از نظر دما امکان اجرای ۱۳ واکنش متفاوت را به صورت

آزمون های PCR چهارگانه (مجموعاً ۲۴ واکنش برای هر لوکوس) در مورد هر ۱۳ لوکوس به صورت مستقل با موفقیت اجرا گردیدند. دستیابی به یک برنامه واحد مشترک از نظر دما و اجزاء سازنده با توجه به یافته های مستقل ۱۳ لوکوس امکان پذیر گردید و در عمل همه لوکوس ها با موفقیت در جریان یک فرآیند PCR تکثیر گردیدند. محصولات ۱۳ گانه با موفقیت در آزمایشگاه همکار تعیین توالی نوکلئوتیدی شدند و بررسی مقایسه ای آنها با ژنوم سویه استاندارد *Bacillus anthracis* Sterne 34F2 نشان دهنده مطابقت کامل محصولات با قطعات هم ارز در ژنوم این سویه بود. تکثیر لوکوس های ۱۳ گانه در تمام ۱۲ جدایه حاد با استفاده از برنامه به دست آمده PCR با موفقیت صورت پذیرفت.

بحث

اهمیت باسیلوس آنتراسیس به عنوان یکی از مناسب ترین ارگانیزم های قابل استفاده در فعالیت های خرابکارانه

توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و در قالب یک پروژه تحقیقاتی به شماره ۹۲۱۰۷-۱۸-۱۸-۲ تامین گردیده است. زهرا نجفی علیا در حال حاضر دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی پزشکی مؤسسه رازی می باشد و این مقاله ناظر بر بخشی از یافته های پروژه کارشناسی ارشد نامبرده می باشد. از غلامرضا مؤذنی جولای و حسین رزاز به جهت فراهم نمودن تعدادی از جدایه های مورد استفاده در این تحقیق تشکر می گردد. مؤلفین مراتب قدرشناسی و سپاس خود را نسبت به Paul Keim و Talima Pearson از دانشگاه ایالتی آریزونا شمالی آمریکا به واسطه نظرات کارشناسی سازنده و همکاری ایشان در پیشبرد این پژوهش اعلام می نمایند.

References

1. Van Ert MN, Easterday WR, Huynh LY, Okinaka RT, Hugh-Jones ME, Ravel J, et al. *Global genetic population structure of bacillus anthracis*. PLoS One. 2007; 2(5): e461.
2. Jula GM, Sattari M, Banihashemi R, Razzaz H, Sanchouli A, Tadayon K. *The phenotypic and genotypic characterization of bacillus anthracis isolates from iran*. Trop Anim Health Prod. 2011; 43(3): 699-704.
3. Joshi SG, Cymet HB, Kerkvliet G, Cymet T. *Anthrax in america 2001-2003*. J Natl Med Assoc. 2004; 96(3): 344-50.
4. Hoffmaster AR, Fitzgerald CC, Ribot E, Mayer LW, and Popovic T. *Molecular subtyping of bacillus anthracis and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, united states*. Emerg Infect Dis. 2002; 8(10): 1111-6.
5. Okinaka RT, Henrie M, Hill KK, Lowery KS, Van Ert M, Pearson T, et al. *Single nucleotide polymorphism typing of bacillus anthracis from sverdlovsk tissue*. Emerg Infect Dis. 2008; 14(4): 653-6.
6. Wilkening DA. *Sverdlovsk revisited: Modeling human inhalation anthrax*. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103(20): 7589-94.
7. Palmateer NE, Hope VD, Roy K, Marongiu A, White JM, Grant KA, et al. *Infections with spore-forming bacteria in persons who inject drugs, 2000-2009*. Emerg Infect Dis. 2013; 19(1): 29-34.
8. Hiendleder S, Kaupe B, Wassmuth R, Janke A. *Molecular analysis of wild and domestic sheep questions*

همزمان در یک دور فعالیت ماشین PCR فراهم می نماید. این درحالی است که در اجرای روش van Erth برخی از محققین دیگر از بیش از یک برنامه برای تکثیر قطعات ژنتیکی مورد نظر استفاده نموده اند.

نتیجه گیری

یافته مهم این تحقیق را در ساده سازی روش Van Erth در مطالعه SNP typing باسیلوس آنتراسیس بیان نمود که برخلاف روش اصلی، انجام آن بدلیل استفاده از دستگاه های متعارف ترموسایکلر در اکثر آزمایشگاه های میکروب شناسی قابل اجرا می باشد.

تشکر و قدردانی

هزینه های مربوط به انجام این تحقیق به طور کامل

current nomenclature and provides evidence for domestication from two different subspecies. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. 2002; 269(1494): 893-904.

9. McNeill JR. *Europe's place in the global history of biological exchange*. Landscape Research. 2003; 28(1): 33-39.

10. Carver T, Harris SR, Berriman M, Parkhill J, McQuillan JA. *Artemis: An integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data*. Bioinformatics. 2012; 28(4): 464-9.

11. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, and Rozen SG. *Primer3--new capabilities and interfaces*. Nucleic Acids Res. 2012; 40(15): e115.

12. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, and Madden TL. *Primer-blast: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics. 2012; 13: 134.

13. McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, et al. *Analysis tool web services from the embl-ebi*. Nucleic Acids Res. 2013; 41(Web Server issue): W597-600.

14. Aikembayev AM, Lukhnova L, Temiraliyeva G, Meka-Mechenko T, Pazylov Y, Zakaryan S, et al. *Historical distribution and molecular diversity of bacillus anthracis, kazakhstan*. Emerg Infect Dis. 2010; 16(5): 789-96.

A Simplified Van Erth Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Typing Method of *Bacillus Anthracis* Applicable by Traditional Thermocycler Machines

Najafi Olya, Z. (BSc)

MSc Student of Microbiology,
Department of Veterinary Aerobic
Bacteria, Razi Institute, Karaj, Iran

Tadayon, K. (PhD)

Assistant Professor of
Microbiology, Razi Institute, Karaj,
Iran

Ghaderi, R. (PhD)

PhD of Microbiology, Department
of Veterinary Aerobic Bacteria,
Razi Institute, Karaj, Iran

**Corresponding Author: Tadayon,
K.**

Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir

Received: 22 May 2014

Revised: 9 Jun 2014

Accepted: 11 Jun 2014

Abstract

SNP typing is now a well-established genotyping system in *Bacillus anthracis* studies. In the original standard method of Van Erth, SNPs at 13 loci of the *B. anthracis* genome were analyzed. In order to simplify and make appropriate this expensive method to low-budget laboratory settings, 13 primer pairs targeting the 13 corresponding SNPs were designed. Besides, a universal PCR protocol was developed to enable simultaneous amplification of all loci by conventional PCR machines. The efficiency of this approach was approved by applying on nine isolates of *B. anthracis*. We recommend using this modified procedure as an efficient alternative to Van Erth method until developing newer and affordable techniques.

Keywords: Bacillus Anthracis, Genotyping, SNPs, PCR