نگاهی بر تکنیک‌های مولکولی در بیولوژی خاک

محمدرضا ساریخانی

استادیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
(rsarikhani@yahoo.com)

چکیده

شاخه بیولوژی خاک که هدف آن شناسایی موجودات خاک به ویژه میکروارگانیسم‌ها و به کار گرفتن آن در حیطه‌های کشاورزی، بیوتکنولوژی و محیط زیست است، بستر زاینده‌ای برای علوم مختلف محسوب می‌شود. نکته قابل تامل آن است که با استفاده از روش‌های سنتی و مرسوم آزمایشگاهی تنها یک درصد جامعه میکروبی خاک شناسایی شده است و 99 درصد پتانسیل زیستی خاک ناشناخته مانده است. ارائه تکنیک‌هایی مبتنی بر مولکول اسیدهای نوکلئیک (DNA و RNA) و پروتئین‌ها شاخه‌های نسبتاً نوپایی می‌باشند که به مطالعات در این حیطه سرعت بخشیده است. روش‌های بکار گرفته شده در استخراج RNA و DNA، RT-PCR و Real-Time PCR همچنین انگشت‌نگاری‌های مبتنی بر PCR (نظیر AFLP، RFLP، SCAR و...)، پروب‌های نشاندار، ریزآرایه‌های DNA و ژن‌های گزارشگر زمینه‌هایی برای شناسایی گونه‌های میکروبی، تشخیص و کمی‌سازی ابراز ژن فراهم نموده است. پیشرفت در روش‌های مولکولی با ابداع PCR فهم ما را از گونه‌های میکروبی، وظایف و کارکردهای آن‌ها، اثرات متقابل آن‌ها با دیگر موجودات و محیط اطرافشان افزایش داده است.

کلمات کلیدی: PCR، انگشت نگاری DNA، ابراز ژن، ژن‌های گزارشگر، ریزآرایه

مقدمه

خاک‌ها محیط‌های پیچیده‌ای هستند که منبع میکروارگانیسم‌ها و ژن‌ها تلقی می‌شوند. باکتری‌ها که بخش مهمی از میکروفلور خاک را تشکیل می‌دهند به لحاظ تنوع گونه‌ای و فعالیت متابولیکی در چرخه‌های غذایی، تجزیه و تغییر شکل‌های زیستی فعالیت دارند و برای کاربردهای مختلف از این بستر جداسازی و استخراج می‌شوند. بر اساس برآورد جدیدی که صورت گرفته است در هر گرم خاک ممکن است 10 میلیارد باکتری و حدود 4000 تا 7000 گونه یا ژنوم متفاوت باکتریایی حضور داشته باشد (Dubey et al., 2006; Ranjard et al., 2000). در کشت‌های میکروبی گروهی که سریع رشد هستند و با شرایط محیط و رشد سازگارند، سریع‌تر رشد یافته و هیچ تضمینی وجود ندارد که این گونه رشد یافته، در محیط محیط خاک نیز نقش بارز و مهمی ایفا نماید (Dubey et al., 2006; Saleh-lakha et al., 2005). پیشرفت در بیولوژی مولکولی منجر به توسعه روش‌های مستقل از کشت برای تشریح و مطالعه جامعه میکروبی به ویژه باکتری‌های خاک شده است. این راهکارها بر پایه آنالیز DNA می‌باشد که مستقیماً از نمونه‌های محیطی استخراج شده‌اند و دیگر نیازی به مراحل جداسازی و کشت باکتری وجود ندارد. این روش شامل استخراج مولکول اسیدهای نوکلئیک، تکثیر آن به کمک PCR، همسانه‌سازی و توالی‌یابی آن می‌باشد. این روش‌ها با لیز کردن مستقیم سلول‌های باکتریایی در خاک و استخراج اسیدهای نوکلئیک دنبال می‌شود (Ranjard et al., 2000; Dubey et al., 2006; Juste et al., 2008). تکنیک‌های مولکولی در حیطه سیستماتیک (تاکسونومی و فیلوژنی)، ژنتیک جمعیت و اکولوژی تا تشخیص و بررسی ابراز یک ژن خاص کاربرد دارند (Gasser, 2006). گام اصلی و ضروری در ارزیابی مولکولی جوامع میکروبی، انتخاب ژن یا مارکر ژنتیکی است که برای تمایز قائل شدن در محدوده وسیعی از موجودات میکروبی قابل استفاده باشد. برای این منظور دو دسته از ژن‌ها قابل استفاده خواهند بود. الف) ژن‌های محافظت شده عمومی و حاضر در همه جا، نظیر توالی ژن‌های اپرون ریبوزوم (ژن‌های *rrs* و *rrl*) که به ترتیب رمزکننده 16S rRNA و 23S rRNA و همچنین فاصله بین ژن‌های فوق یعنی IGS[1]، در این ارتباط بهره‌گیری از mtDNA و واحدهای تکراری DNA نیز مورد توجه است ب) ژن‌های عملکردی[2] که این ژن‌ها آنزیم-

[1] Intergenic spacer
[2] Functional genes

های کلیدی را در یک فرایند خاص زیستی رمز می‌کنند. مورد اول برای انعکاس تفاوت‌های فیلوژنتیکی در اکولوژی مولکولی و مورد دوم برای مطالعه تنوع عملکردی قابل استفاده است (Juste et al., 2008; Ranjard et al., 2000). در برخی مطالعات از ژن‌های عملکردی درگیر در چرخه ازت، مقاومت به فلزات سنگین یا تولید آنتی‌بیوتیک به عنوان مارکرهای مولکولی برای ارزیابی توزیع و تنوع جمعیت‌های فعال جوامع خاک استفاده شده است. همسانه‌های حاصل از قطعات تکثیری به کمک PCR ممکن است مستقیماً 1) توالی‌یابی شوند یا 2) بعد از برش آنزیمی، قطعاتی از آن توالی یابی شوند (شکل 1). دلیل استفاده از ژن‌های *rrs*، *rrl* و IGS به عنوان مارکر مولکولی به چند دلیل است 1) فراوانی همه‌گیر آن‌ها 2) ویژگی‌های فیلوژنتیک و تکاملی آن، که هم دارای مناطق شدیداً حفاظت شده است و هم دارای توالی‌های متغیر 3) پتانسیل بالای آن برای متمایز کردن 4) طبیعت چند نسخه‌ای بودن آن که منجر به حساسیت روش آنالیزی می‌شود 5) فراهمی گسترده توالی‌های آن در پایگاه‌هایی نظیر Gen Bank و RDP[1]. استفاده از ژن‌های فوق ممکن است با مشکلاتی نیز همراه باشد. ممکن است نسخه‌های متفاوتی از نظر توالی در ژنوم یک موجود وجود داشته باشد به همین دلیل چندین ریبوتایپ[2] از یک موجود حاصل شود که تفسیر آنالیز را مشکل می‌سازد. بعلاوه با استفاده از توالی‌های ریبوزومال شاید موجودات خیلی شبیه به هم از همدیگر قابل تمایز نباشند. به همین خاطر استفاده از ژن‌های جایگزین نظیر ژن‌های خانه‌دار[3] از قبیل ژن‌های *gyr*B: رمزکننده gyrase B، *tuf*، *rpo*B رمزکننده RNA polymerase B توصیه می‌شود، اما پایگاه اطلاعات این گروه از ژن‌ها اندک بوده و تنها تعداد کمی از توالی‌ها را دارا می‌باشد (Juste et al., 2008).

تکنیک‌های مولکولی را در چند شاخه می‌توان مورد بررسی قرار داد. برخی از این تکنیک‌ها صرفاً در ارتباط با یک گونه زنده میکروبی می‌باشد و می‌تواند برای بررسی رفتار یک ژن مورد استفاده قرار گیرد و تحت شرایط محیطی مختلف میزان ابراز ژن را مشخص سازد. در این روش بعد از اتصال ژن‌های گزارشگر نظیر *gfp*، *lux*، *lac*Z، GUS به ژن مورد نظر ابراز آن را مورد ارزیابی قرار می‌دهند. در این روش بایستی بعد از تهیه نمونه میکروبی دست‌ورزی شده مطالعات خود را دنبال نمود و از ناقل‌های مناسب تحت کنترل راه‌اندازهای مناسب استفاده نمود. بررسی ابراز ژن فقط منوط به روش مبتنی بر کشت سلولی نمی‌شود و از سایر روش‌ها نظیر استفاده از ریزآرایه‌ها[4] و تکنیک Real-Time PCR نیز می‌توان بهره گرفت (شکل 1). در تکنیک ریزآرایه علاوه بر تشخیص وجود یا عدم وجود یک ژن، می‌توان میزان ابراز یک ژن را نیز تعیین نمود، همچنین در شناسایی نیز می‌توان از آن استفاده نمود. ریزآرایه‌ها ابزاری هستند که آنالیز همزمان تعداد زیادی از ژن‌ها را فراهم می‌آورند. این تکنولوژی برای تشخیص توالی‌های ویژه DNA یا پایش ابراز ژن تحت شرایط متفاوت رشد سلول و همچنین برای تشخیص موتاسیون یا جهش‌های ویژه در توالی‌های DNA توسعه یافته است. از این ابزار برای شناسایی باکتری‌ها و آنالیز جمعیت میکروبی نیز استفاده شده است (Saleh-lakha et al., 2005). اخیراً دو نمونه از آرایه‌های DNA توسعه یافته‌اند، گروهی که بر روی غشاء نایلون تهیه می‌شوند و دارای تراکم کمتری از آرایه‌ها هستند و دیگری ریزآرایه با دانسیته بالا که بر روی اسلاید شیشه‌ای تهیه می‌شوند و ممکن است شامل صدها یا میلیونها اولیگونوکلئوتید شناساگر باشند. معمولاً آرایه‌های DNA بر اساس ژن‌های هدفی که شناسایی می‌نمایند حداقل در سه گروه تقسیم‌بندی می‌شوند. الف) گروه آرایه‌های فیلوژنتیک: بر اساس مارکرهای تشخیصی نظیر ژن 16S rRNA برای تشخیص میکروبی می‌باشد ب) گروه آرایه‌های ژن‌های عملکردی: که برای تشخیص ژن‌های کلیدی در یک محیط طراحی شده‌اند و ج) گروه آرایه‌های متاژنومیک[5] که بر خلاف موارد فوق شامل قطعات DNA برگرفته از طبیعت و مربوط به باکتری‌های غیر قابل کشت است (Juste et al., 2008). استفاده از آرایه‌های ژن‌های عملکردی می‌تواند برای تشخیص و سنجش حضور ژن‌های کلیدی در فرایندهای خاک نظیر نیتریفیکاسیون، دنیتریفیکاسیون یا متانوژنز مورد استفاده قرار گیرد یا به کمک آن در کشت‌های خالص میکروبی تحت شرایط مختلف محیطی آنالیز ابراز عمومی ژن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد (Saleh-lakha et al., 2005). روش ریزآرایه روشی کم هزینه، اتوماتیکی، سریع و با اثرات زمینه حداقل می‌باشد.

[1] Ribosomal Databank Project
[2] Ribotype
[3] Housekeeping genes
[4] DNA array
[5] Metagenomic

روش‌های انگشت‌نگاری[1] ژنتیکی که در ابتدا برای تمایز و تشخیص کشت‌های خالص سویه‌های باکتریایی استفاده شد. به اشکال مختلف قابل استفاده است (جدول 1). محصول PCR می‌تواند از طریق انگشت نگاری ژنتیکی مورد آنالیز قرار بگیرد. که تصویر کلی از ساختار ژنتیکی جمعیت باکتری به ما می‌دهد. تکنینک انگشت‌نگاری ژنتیکی نیازی به کتابخانه همسانه‌ها ندارد و بر مهاجرت افتراقی الکتروفورزی بر روی ژل آگاروز یا پلی‌اکریل‌آمید بنا شده است که به اندازه (RAPD، RISA، ARDRA، T-RFLP) یا توالی (DGGE و TGGE) وابسته می‌باشد. این روش به ویژه برای مقایسه جوامع باکتریایی مناسب می‌باشد و در نهایت دندروگرام شباهت یا خویشاوندی آن‌ها با توجه به الگوی باندی رسم می‌شود (Ranjard et al., 2000).

جدول 1- برخی از روش‌های مولکولی مورد استفاده در بررسی نمونه‌های خاک (Juste et al., 2008; Dubey et al., 2006; Saleh-lakha et al., 2005; Juste et al., 2008).

روش	معایب	مزایا	توضیحات
DGGE TGGE	برای قطعات کوتاه (200-700 جفت باز)، عدم تکرارپذیری، سختی تکنیک در ایجاد شیب خطی و بهینه‌سازی روش	انجام تفکیک براساس الگوی باندی ، عدم نیاز به توالی یابی	استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌کننده، برای ایجاد شیب خطی از عوامل واسرشته‌ساز نظیر دما، اوره یا فرمامید استفاده می‌شود
SSCP	برای قطعات کوتاه (100-500 جفت باز)	نیاز به شیب خطی عامل واسرشته-کننده ندارد، تشخیص موتاسیون	استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید غیرواسرشته‌ساز، برای اندازه‌های یکسان ولی با توالی متفاوت کاربرد دارد
ARDRA RISA	نوع آنزیم برشی		استفاده از توالی اپرون ریبوزومی یا توالی حدواسط بین ژن‌های ریبوزومی، بعد از برش آنزیمی همه قطعات برشی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد
T-RFLP	نوع آنزیم برشی	بدون نیاز به توالی‌یابی، تنها قطعه نهایی نشاندار ارزیابی می‌شود	استفاده از آغازگرهای نشاندار شده با فلورسنت برای تکثیر قطعه مورد نظر و سپس برش آنزیمی
RAPD	عدم تکرارپذیری، قادر به تهیه اطلاعات فیلوژنتیک نمی‌باشد		استفاده از یک جفت آغازگر تصادفی برای تکثیر ناحیه‌ای از ژنوم، استفاده از آغازگر با اختصاصیت پائین و طول کوتاه (10 جفت باز)
AFLP	زمان‌بر بودن	نیاز به اطلاعات توالی ژنوم ندارد، قابل استفاده برای آنالیز DNA از هر منشایی	برش مولکول اسیدنوکلئیک با دو آنزیم برشی، اتصال اداپتور به انتهای قطعات برش یافته، تکثیر با استفاده از آغازگرهای متصل شونده به اداپتورها و سپس آنالیز الکتروفورزی قطعات
Reporter Genes	ویژگی لومینسانسی و فلورسنتی متاثر از شرایط محیطی بوده، مزاحمت فلورسنتی زمینه توسط ذرات و باکتری‌های فلورسنت یا فعالیت زمینه بتاگالاکتوزیدی، نیاز به سوبسترای خاص در مواردی (لوسیفرین و...)، نیاز به سویه تراریخته	مزایای *gfp*: قابل استفاده در یوکاریوتها و پروکاریوتها، عدم نیاز به سوبسترا یا کوفاکتور خارجی، بالا بودن حساسیت و راحتی آشکارسازی، پایداری و مقاومت آن به تخریب ساختمان	ژن‌های گزارشگر نظیر *gfp*، *lux*، *lacZ* و GUS ابزاری برای مطالعه و کمی‌سازی فعالیت ژن به شکل درجا را به ما می‌دهد و فنوتیب ابراز یک ژن خاص را تعیین می‌کند
SIP FISH	نیاز به ساخت پروب، در هر هیبریداسیون تنها تعداد محدودی پروب را می‌توان استفاده کرد، روش (SIP) نیاز به زمان انکوباسیون طولانی دارد (بیش از 40 روز)، سوبسترای بکار رفته در آن	روش FISH در چند ساعت قابل انجام می‌باشد	تکنیک‌های مبتنی بر پروب تنها به وجود یا عدم وجود یک ژن اشاره می‌کنند FISH: این روش تلفیقی از روش‌های هیبریداسیون DNA و مشاهده میکروسکوپی

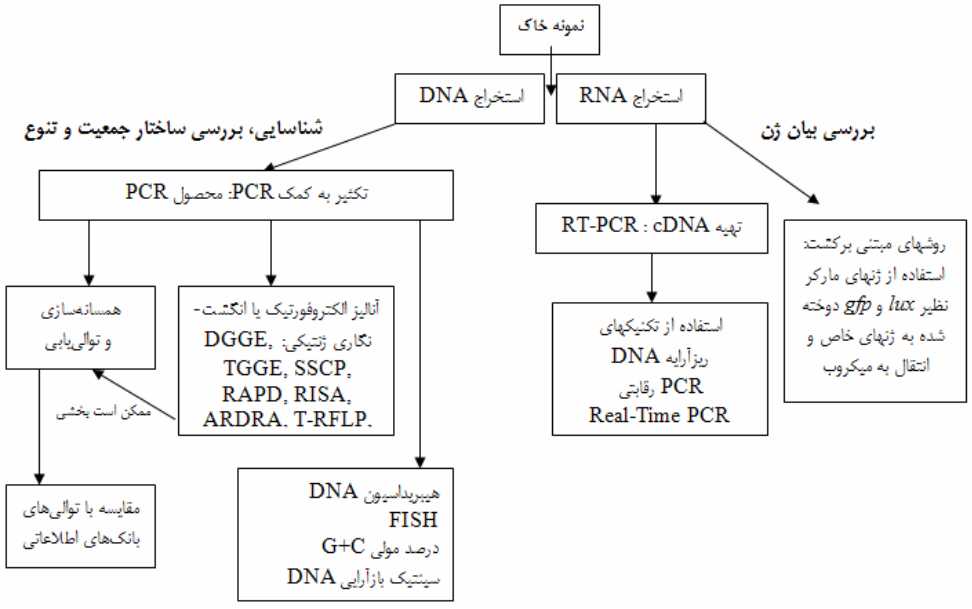
[1] Finger printing

می‌باشد. پروبهای نشاندار پایدار به دو صورت DNA-SIP و RNA-SIP قابل اجراست.		بایستی نزدیک به 100 درصد نشاندار شده باشد که هزینه‌بر می‌باشد	
بعد از تهیه cDNA از RNA استخراجی اقدام به بررسی میزان ابراز یک ژن می‌شود، اجازه می‌دهد تا تکثیر در چرخه PCR در زمان واقعی (با شدت تابش رنگ‌های فلورسنت) پایش شود	عدم استفاده از رنگ‌های اتیدیوم بروماید، کم هزینه، عدم نیاز به ژل آگاروز، تاکید بر فاز لگاریتمی به جای فاز پایانی تکثیر، مطالعه همزمان تعداد زیادی نمونه (تا 96 نمونه)	محدودیت این روش شبیه روش ریزآرایه بوده و اسیدهای هومیک، رس‌ها و بازدارنده‌های آنزیمی نیز در این روش ممکن است مزاحمت ایجاد نمایند	Real-Time PCR

DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis), TGGE (Termal gradient gel electrophoresis), SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), ARDAR (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SIP (Stable isotope probe), FISH (Fluorescence In Situ Hybridization).

نتیجه‌گیری

شاید یکی از مهمترین ابداعات در زمینه مولکولی ابداع PCR توسط کری مولیس در سال 1985 باشد. در ایران همگام با این پیشرفت‌ها برای نخستین بار در سال 1372 این تکنیک به کار گرفته شد و این در حالی است که استفاده از تکنیک‌های ملکولی با سرعت کندتری در بخش بیولوژی خاک دنبال می‌شود. تکنیک‌های مولکولی در ارتباط با نمونه‌های خاک ممکن است در ابعاد مختلف با اهدافی نظیر 1- تعیین وجود یا عدم وجود یک گونه خاص (یا ژنی خاص) 2) پراکنش و توزیع گونه‌ها (یا ژن‌های ویژه) 3) کمی‌سازی (به عنوان نمونه ابراز یک ژن خاص تحت شرایط ویژه یا تعیین تعداد یک گونه خاص) به کار گرفته شوند و در اغلب موارد استخراج اسیدهای نوکلئیک از خاک نخستین گام ضروری در کاربرد این تکنیک‌ها می‌باشد. با پیشرفت این روش‌ها اخیراً ژن‌های جدیدی که رمزکننده آنزیم‌های مهمی می‌باشند با استفاده از روش متاژنومیک از میکروارگانیسم‌های غیرقابل کشت جداسازی شده است. با توجه به اهمیت و جایگاه روش‌های مولکولی بایستی در مطالعات آینده نگاه ویژه‌ای به استفاده از این روش‌ها داشته باشیم.



شکل 1 – روش‌های مولکولی مورد استفاده در بررسی نمونه‌های خاک (استنتاج از uste et al., 2008; Dubey et al., 2006; Saleh-lakha et al., 2005; Juste et al., 2008).

منابع

Ranjard L, Poly F, Nazaret S, 2000. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. Res. Microbiol. 151: 167–177.

Juste A, Thommad BPHJ, Lievens B, 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. Food Microbiology 25: 745– 761.

Dubey SK, Tripathi AK, Upadhyay SN, 2006. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. Bioresource Technology 97: 2217–2224.

Gasser RB, 2006. Molecular tools-advances, opportunities and prospects. Veterinary Parasitology 136: 69–89.

Saleh-Lakha S, Miller M, Campbell RG, Schneider K, Elahimanesh P, Hart MM, Trevors JT, 2005. Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. Journal of Microbiological Methods 63: 1-19.