ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۱
صفحه ۳۲۴-۳۱۳

متاژنومیکس و کاربرد آن در شناسایی تنوع ژنتیکی اکوسیستم های میکروبی

Metagenomics and its application in identification of genetic diversity of microbial ecosystems

میثم طباطبایی*[۱]، هلن پورمظاهری[۲]

۱- استادیار بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

Tabatabaei M[1*], Pourmazaheri H[2]

1. Assistant Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)
2. MSc Student, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:Meisam_Tabatabaei@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۲ – تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۵)

چکیده

ریز سازواره‌ها پایه و اساس حیات بر روی کره زمین بوده و درجه بالایی از تنوع زیستی را عرضه می‌نمایند. این تنوع عظیم ژنتیکی و زیستی می‌تواند در جهت افزایش شناخت ژن‌های جدید، مسیرهای متابولیک و محصولات آن مورد استفاده قرار گیرد. شناسایی تنوع ژنتیکی و زیستی ریزسازواره‌ها بخش مهمی از تحقیقات علمی را تشکیل می‌دهد. بسیاری از ریزسازواره‌ها را نمی‌توان در شرایط آزمایشگاه کشت داد که این موضوع در درک فیزیولوژی، ژنتیک و اکولوژی جامعه میکروبی محدودیت ایجاد می‌نماید. راه حل مناسب رفع این مشکل استفاده از دانش و ابزاری جامع به نام متاژنومیکس یعنی همسانه‌سازی با استفاده از روش‌های مستقل از کشت است. یکی از بهترین روش‌ها در هدف‌گیری ژن در متاژنومیکس PCR-DGGE است که در آن محصول DNA PCR استخراج شده از جوامع میکروبی، به کمک آغازگرهای اختصاصی 16S rRNA در گروه های عمده میکروبی مانند باکتری ها، آرکی ها و استفاده از آغاز گرهای 18S rRNA در گروه های یوکاریوتی به دست می‌آید که نتیجه آن تکثیر قطعاتی هم اندازه و با طول یکسان می باشد. DGGE تکنیکی برای جداسازی قطعات اسید نوکلئیک است که از لحاظ اندازه توالی یکسان بوده اما به لحاظ محتوای توالی متفاوت هستند. با استفاده از روش DGGE، تشخیص بیماری های میکروبی و شناسایی ریز سازواره هادر مقیاس بزرگ می تواند ساده تر و سریع تر به دست آید. در این بررسی سعی شده به طور خلاصه به مکانیسم اجرا، کاربردها، مزایا و معایب این فناوری پرداخته شود.

واژه‌های کلیدی

**تنوع ژنتیکی،
جوامع میکروبی،
متاژنومیکس،
DGGE،
DNA.**

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.1.2]

مقدمه

امروزه برای درک بهتر فرآیندهای زنده اغلب می توان آنها را در سیستم های ساده مانند جانداران کوچک و میکروسکوپی (ریز سازواره ها) که پایه و اساس حیات بر روی کره زمین بوده و همچنین تنوع زیستی با طیف وسیعی را عرضه می نمایند، به جای یک ساختار پیچیده مانند انسان مورد مطالعه قرار داد. ریز سازواره ها دارای بسیاری از خواص مشابه با موجودات زنده پیچیده هستند. به طور مثال بسیاری از آنها دارای توانایی تخریب مواد زاید بوده و همچنین قادر به ساخت داروهای جدید در زمینه پزشکی، ساخت پلاستیک های سازگار با محیط زیست و یا حتی ساخت برخی از مواد تشکیل دهنده غذا هستند. در نتیجه، شناسایی تنوع ژنتیکی و زیستی ریز سازواره ها بخش مهمی از تحقیقات علمی را شامل می‌شود (Hugenholtz and Pace 1996، Rappe and Giovannoni 2003; Shelswell 2004). تعداد کل سلول های شبه هسته داران $۱۰^{۳۰} \times ۶-۴$ برآورد شده است (Schloss and Handelsman 2005) که از $۱۰^{۶}$ تا $۱۰^{۸}$ گونه ژنتیکی مجزا (گروه های متمایز تاکسونومیکی مبتنی برتجزیه توالی ژن) تشکیل شده اند (Amman et al. 1995). این تنوع عظیم ژنتیکی و زیستی می تواند در بهبود شناخت ژن های جدید، مسیرهای متابولیک و محصولات آنها مورد استفاده قرار گیرد (Cowan 2000). بررسی ها نشان داده اند که در روش "کشت میکروبی[1]" تنها بخشی از تنوع میکروبی در آنالیزها وارد می‌شود و بخش عظیمی از جامعه میکروبی از دست می‌رود (Amman et al. 1995; Hugenholtz and Pace 1996; Hugenholtz et al. 1998) و به تبع آن نیز نتایج حاصله نمی تواند آیینه تمام نمایی از آنچه در محیط مورد بررسی رخ می‌دهد به حساب آید. توسعه فناوری های متاژنومیکس در بیش از ۵ سال گذشته، دسترسی به بسیاری از اطلاعات ژنتیکی شبه هسته داران موجود در نمونه های زیست محیطی را بدون استفاده از کشت فراهم کرده است (Schlossand Handelsman 2003 و Stevenson et al. 2004). این مسئله می‌تواند کمک قابل توجهی به ادراک جامع و کامل محققین از جامعه میکروبی نموده و به دنبال آن در پیشرفت عرصه‌های کاربردی مطالعات میکروبی مانند کشاورزی، صنایع غذایی، پزشکی، صنعت نفت و غیره نقش بسزایی داشته باشد.

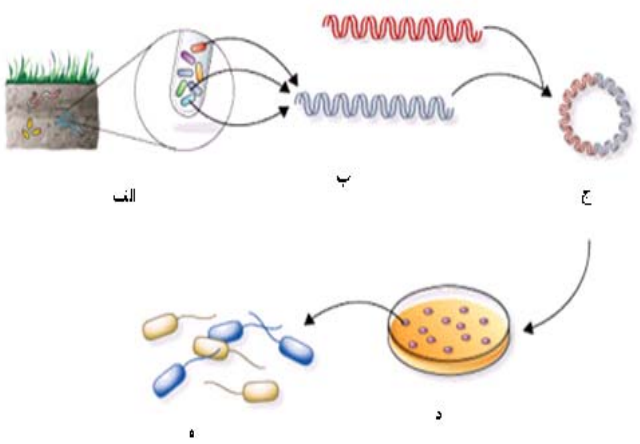
متاژنومیکس

بیش از ۹۹ درصد از شبه هسته دارانی محیط زیست را نمی توان با استفاده از فناوری های کشت میکروبی موجود، در شرایط آزمایشگاه کشت داد که این موضوع سبب محدودیت در درک فیزیولوژی، ژنتیک و اکولوژی جامعه میکروبی می گردد. راه حل مناسب رفع این مشکل استفاده از دانش و ابزاری جامع به نام متاژنومیکس است که در آن بدون کشت میکروارگانیسم ها، تنوع میکروبی موجود در محیط مورد نظر بررسی می شود. در این روش، DNA کل میکروبی[2] به طور مستقیم از نمونه های زیست محیطی استخراج شده و ارزیابی های ژنتیکی بر روی آن به انجام می رسد. پیشرفت های اخیر در فناوری های توالی یابی از قبیل شات[3] گان، پایروسکونسینگ[4] و روش های محاسباتی و بیوانفورماتیک سبب پیشرفت دانش متاژنومیکس در ارائه دیدگاهی اجمالی از زندگی ریزسازواره های غیر قابل کشت[5] در آزمایشگاه گردیده است. در واقع متاژنومیکس عرصه ای جدید و ترکیب یافته از زیست شناسی مولکولی و ژنتیک است. تحقیقات متاژنومیکسی با مطالعات نظم آرایی ژن[6]، ژنومیکس عملکردی و بیان ژن‌ها، پروتئومیکس، متابولومیکس و همچنین مطالعات میکروسکوپی ارتباط و همبستگی نزدیک داشته و در حال حاضر بینش صحیحی را در حل مشکلاتی از قبیل تکامل ژنوم و عدم توانایی ما در درک جایگاه ویژه اغلب میکروارگانیسم هایی که نمی توان کشت خالصی از آنها تهیه نمود، ارائه داده است (Allen and Banfield 2005 ; Pontes et al. 2007). این فناوری به صورت یک فرایند چند مرحله ای بوده که متکی بر چهار مرحله اصلی می باشد (شکل ۱). ۱- جداسازی ماده ژنتیکی کل موجودات زنده میکروسکوپی موجود در محیط مورد مطالعه

[1] Microbial culture

[2] Total microbial DNA
[3] Shutgun
[4] Pyrosequencing
[5] Unculturable
[6] Gene array

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.1.2]



شکل ۱- فرایند متاژنومیکس، الف) جدا سازی ریز سازواره ها؛ ب) استخراج ماده ژنتیکی؛ ج) انتقال ماده ژنتیکی به ناقل؛ د) انتقال به میزبان مورد نظر، ساخت کتابخانه و انتخاب نوترکیب ها؛ ه) تجزیه و تحلیل مواد ژنتیکی در کتابخانه متاژنومیکس.

۲- انتقال مواد ژنتیکی به ناقل‌ها ۳- ساخت کتابخانه ژنومی ۴- تجزیه و تحلیل مواد ژنتیکی در کتابخانه متاژنومیکس. اطلاعات بدست آمده از کتابخانه های متاژنومیکسی می تواند نقش بسیار موثری در توسعه جنبه های کاربردی میکروارگانیسم ها در صنعت، کشاورزی، پزشکی و محیط زیست داشته باشد. گستره بهره برداری از اطلاعات فراهم آمده از فناوری متاژنومیکس به گونه ای است که می تواند در ایجاد تعامل بهتر جامعه انسانی با محیط زیست مورد استفاده قرار گیرد(Shelswell 2004).

روش های استخراج ماده ژنتیکی در مطالعات متاژنومیکسی

روش های استخراج DNA

نوع روش استخراج DNA مورد استفاده در مطالعات متاژنومیکس، نقش بسیار موثری در اعتبار و حصول اطمینان از نتایج، در بررسی غنا و تنوع میکروبی موجود در نمونه دارد. راهبرد اصلی جهت بدست آوردن DNA متاژنومی، تهیه سلول ها و لیز نمودن مستقیم آنهاست. لیز نمودن مستقیم به دو روش مکانیکی و شیمیایی صورت می گیرد مطالعات نشان داده اند که روش های مکانیکی تنوع بیشتری را در مقایسه با تیمارهای شیمیایی فراهم می کنند (Niemi et al. 2001). با این حال، لیز شیمیایی می تواند DNA با وزن مولکولی بالاتری را استحصال کرده و در برخی از تاکسون‌ها با توجه به برخی ویژگی های بیوشیمیایی منحصر بفردشان (مانند ترکیب دیواره های سلولی) بهتر عمل کند.

روش غیر مستقیم که در آن سلول های میکروبی موجود در ماتریس نمونه، پیش از استخراج DNA جداسازی می شوند، سبب به حداقل رساندن مشکلات ناشی از آلاینده های معدنی و بالاخص آلی می شود (Bey et al. 2010)، اما در این روش، میزان DNA استحصال شده کاهش می یابد و علاوه بر آن، بسته به شدت اتصال سلول ها به ماتریس نمونه محیطی، راندمان استخراج تحت تاثیر قرارگرفته و کاهش می یابد یا منفی شود (Tabatabaei et al. 2010). لذا بیشتر مطالعات میکروبی با تکیه بر روش های مستقیم استخراج DNA انجام می شود. مزیت مهم روش مستقیم استخراج DNA آن است که از نظر کمی بازده بیشتری نسبت به روش غیر مستقیم فراهم می نماید. از سوی دیگر با توجه به اعمال روند استخراج بر روی کل نمونه مورد مطالعه، احتمال حذف بخشی از نمونه آن‌گونه که در روش‌های غیر مستقیم محتمل است و منجر به انحراف تحقیقات و متعاقب آن باعث پیچیده تر شدن نتایج بررسی جوامع میکروبی می گردد، منتفی می شود (Bey et al. 2010).

راهبردهای غنی سازی ژنوم[1] می تواند با هدف گیری اجزای فعال جمعیت میکروبی مورد استفاده قرار گیرد (Borneman 1999 ; Urbach et al. 1999). تکنیک ایزوتوپ پایدار نشاندار (SIP)[2]، شامل استفاده از یک سوبسترای ایزوتوپ پایدار نشاندار بوده که در آن جداسازی براساس شیب چگالی سانتریفیوژ می باشد و DNA و RNA در این تکنیک بر اساس وزنشان از هم جدا می گردند. برای نمونه، با بهره گیری از نشاندار $^{13}CH_3OH$ DNA متاژنومی خاک جنگل مورد بررسی قرار گرفت و منجر به شناسایی پروتوباکترهای متیلوتروف[3] و ژن جدید دهیدروژناز متانول[4] (*mxaF*) شد که متعلق به تاکسای اسیدوباکترهاست اسیدوباکترهاست

[1] Genome enrichment strategies
[2] Stable-isotope probing
[3] Methylotroph proteobacteria
[4] Novel methanol dehydrogenases

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.1.2]

(Radajewski et al. 2002). ریزسازواره های فعال در حال رشد نیز می توانند با ۵- برومو۲- دئوکسییوریدین[1] نشاندار شوند و DNA یا RNA نشاندار شده توسط راهکارهای ایمنولوژیکی یا سانتریفوژ شیب چگالی از هم جدا شوند (Urbach et al. 1999). دورگ سازی کاهشی بازدارنده (SSH)[2] می‌تواند تفاوت‌های ژنتیکی بین ریز سازواره هارا شناسایی نماید، از این‌رو روشی قدرتمند برای غنی سازی یک ژن خاص می باشد. در این راهبرد، سازگارسازها به توده‌های DNA متصل شده و دورگ گیری کاهشی، انتخاب قطعات منحصر به فرد DNA را در هر یک از نمونه ها امکان پذیر می سازد. این امر به طور معمول در تجزیه و تحلیل تفاوت های ژنتیکی در بیان ژن کاربرد دارد (Green et al. 2001). تاکنون روش مطالعه الگوهای موجود در بیان ژن، تقریبا به طور انحصاری در هسته داران استفاده شده است. تجزیه و تحلیل بیان متمایز[3] (DEA) ابزار موثری در خصوص غنی سازی است. بیان صفات نمونه متاژنومیکسی را می توان در مقایسه با پیش و پس از قرار گرفتن در معرض سوبسترای خاص و یا افزایش عوامل زیستی خارجی، مورد بررسی قرار داد. در این روش، بیان ژن ها برای شناسایی فعالیت های خاص تحت نظارت قرار داده می شوند. این نوع رویکرد در شناسایی ژن های باکتریایی با بیان بالا در فقدان آهن با موفقیت انجام شده است (Bowler et al. 1999).

روش های استخراج RNA

فناوری استخراج RNA از نمونه های زیست محیطی با روش های استخراج DNA تا حد زیادی مشابهت دارد. پروتکل هایی به منظور کاستن تخریب فیزیکی و فعالیت RNase که علت عمده کاهش بازده تکنیک های استخراجی است، طراحی شده اند. جهت جلوگیری از تخریب و کاهش بازده، ضروری است نمونه های اسید نوکلئیک به دست آمده سریعا مورد پردازش قرار گرفته و یا بلافاصله پس از استخراج در دمای ۸۰ – درجه سانتی گراد منجمد گردند. همچنین برای به حداقل رساندن تخریب RNA می‌توان از رسوب دهی آر ان ای سلولی و پوشش مصنوعی RNA جدا شده استفاده کرد(Ercolini 2004). از روش های ذکر شده در بحث استخراج DNA می‌توان در استخراج RNA نیزاستفاده نمود؛ مانند آنچه که در قسمت قبل به آنها اشاره گردید می‌توان از روش ایزوتوپ پایدار نشاندار (SIP) و نشاندارهای $^{13}CH3OH$ و BrdU نام برد. در هسته‌داران استفاده از mRNA بصورت گسترده ای کاربردی شده است که البته لازم به ذکر است اخیرا در مطالعه متاژنوم شبه‌هسته‌داران از این روش نیز بهره گیری می‌شود. این روش، راهبردی عملی در ساخت کتابخانه های متاژنومیکسی cDNA جهت شناسایی بهتر ژن های عملکردی یوکاریوتی ارائه می دهد (Urbach et al. 1999).

هدف گیری ژن

واکنش زنجیره ای پلیمراز[4] (PCR) ژن های اختصاصی با قابلیت های ویژه متابولیکی و یا توانایی تجزیه کنندگی سوبسترایی خاص به طور گسترده در شناسایی جوامع میکروبی کاربرد دارد. برای نمونه می توان به هدف گیری ژن هایی مانند متان مونو اکسیژناز، متانول دهیدروژناز و آمونیاک مونو اکسیژناز در شناسایی متانوتروف‌ها اشاره کرد. البته استفاده از PCR در ردیابی ژنی ویژه به عنوان ابزاری در کشف فاکتورهای حیاتی با دو اشکال عمده روبرو است نخست، طراحی آغازگر که به اطلاعات موجود در توالی بستگی دارد و خطا در آن ادامه فرایند را با اشکال روبرو می سازد. دوم اینکه فقط قطعه ژن ساختاری توسط PCR تکثیر می شود و به گام های دیگر برای دسترسی به تمام طول ژن نیاز است، البته تکثیر شده‌ها را می‌توان نشان‌دار کرده و به عنوان کاوشگر در شناسایی کل طول ژن (های) موجود در کتابخانه های متداول متاژنومیکس استفاده کرد. روش مبتنی بر PCR می تواند برای دسترسی به نواحی اطراف پایین دست و بالا دست ژن و رسیدن به طول کامل ژن از روش هایی چون گام زنی سریع عمومی[5] (Henckel et al. 1999 ; Mishra et al. 2002)، PCR دسته ماهی‌تابه‌ای[6] (Myrick and Gelbart 2002)، PCR با آغازگرهای تصادفی[7] (Megonigal MD et al. 2000)، PCR

[1] 5-bromo-2-deoxyuridine
[2] Suppressive subtraction hybridization
[3] Differential expression analysis
[4] Polymerase chain reaction
[5] Universal fast walking
[6] Panhandle PCR
[7] Random primed PCR

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.1.2]

معکوس[1] و PCR مبتنی بر آداپتور[2] (Liu and Whittier 1995) استفاده کند. از این روش ها در بازیابی انواع ژن های جدید ۲، ۵- دی کتو گلوکونیک اسید ردوکتاز از DNA نمونه محیط زیستی با موفقیت استفاده شده است.

روش های مورد استفاده در متاژنومیکس

امروزه روش هایی که بر پایه آنالیز مستقیم توالی زیر واحد کوچک[3] (SSU) ژن ریبوزومی (rDNA) تکیه دارند به سرعت جایگزین روش های کشت آزمایشگاهی شده اند، زیرا در این روش‌ها راهکار مناسبی برای مقایسه ترکیب و ساختار جوامع میکروبی ارائه می شود. چنین روش هایی نظیر ARDRA[4]، SSCP[5]، RAPD[6]، RFLP-T[7]، AFLP[8]، TGGE[9]، CDGE[10]، HA[11] و HA و PTT[12] و در نهایت توالی یابی DNA در تجزیه و تحلیل اسید نوکلئیک به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه بر آنها، روش‌های دیگر تجزیه و تحلیل های شیمیایی نظیر نشانگرهای زیستی نیز دارای کارایی بالا هستند، برای نمونه می توان به آنالیز اسید چرب فسفولیپید (PLFA)[13] در تعیین مشخصه های جوامع میکروبی اشاره کرد. از سوی دیگر، برای تشخیص میکروسکوپی سلول های خاص میکروبی، از دورگ سازی فلورسانس در محل (FISH)[14] استفاده می شود. در این زمینه برخی تغییرات در راستای افزایش شدت سیگنال توسعه یافته اند که به برخی از آنها نظیر HNPP-FISH[15]، CARD-FISH[16]، PNA-FISH[17]، RING-FISH[18] و PCR درون‌بافتی می-توان اشاره نمود. یکی از بهترین روش ها برای هدف گیری ژن در متاژنومیکس PCR-DGGE است که علاوه بر کاربرد در مطالعات نمونه های محیطی، روشی محبوب برای مطالعه میکروب های روده انسان و حیوانات نیز محسوب می‌شود (Kim et al. 2007 ; Possemiers et al. 2004). PCR-DGGE به دلیل قابل اعتماد بودن، داشتن تکرارپذیری، سریع و تا حدودی ارزان بودن، بهترین پیشنهاد در این نوع تحقیقات است. همچنین می-توان با استفاده از این روش، نمونه های متعددی را به صورت همزمان مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. بنابراین امکان پیگیری و ردیابی تغییرات در جمعیت های میکروبی نیز وجود دارد (Muyzer and Smalla 1998).

DGGE - الکتروفورز ژل شیب دار واسرشته ساز

روش DGGE توسط لئونارد لرمان و استوارت فیشر[19] در دانشگاه ایالتی نیویورک[20] در آلبانی ابداع شد (Fischer and Lerman 1979). DGGE باستفاده از مقدار کمی نمونه DNA (یا RNA) متاژنوم کار می‌کند و توسط ژل آکریل آمید حاوی عوامل واسرشت کنندهDNA (اوره و فرمامید) در طول ژل الکتروفورز می‌شود. محققین نشان دادند قطعاتی که در آنها جهش ایجاد شده است، با مقایسه محل ذوب DNA در طول شیب ژل در کنار یکدیگر قابل شناسایی هستند (Myers and Lerman 1987). اولین بار جرارد مویزر[21] در سال 1979 از زیر واحد کوچک ریبوزوم برای رمزگذاری ژن‌ها در DGGE بهره گرفت و از آن پس این مدل تبدیل به یک روش گسترده و کارآمد در اکولوژی میکروبی شد (Fischer and Lerman 1979). اصول فوق الذکر بر این مبنا است که محصول PCR استخراج شده از جوامع میکروبی، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی 16S rRNA برای گروه های عمده میکروبی مانند باکتری ها، آرکئا[22] ، و 18S rRNA در گروه های یوکاریوتی به دست می آید که نتیجه آن تکثیر قطعاتی هم اندازه و با طول یکسان می باشد. بنابراین محصول PCR فوق الذکر نمی تواند توسط الکتروفورز ژل آگاروز از یکدیگر جدا شده و چندشکلی مورد انتظار را ایجاد کنند. با این حال، تغییرات توالی (محتوای GC) در بین rRNA های مختلف میکروبی،

[1] Inverse PCR
[2] Adaptor ligation PCR
[3] Small subunit
[4] Amplified ribosomal DNA restriction analysis
[5] Single-strand conformation polymorphism
[6] Random amplified polymorphic DNA
[7] Terminal-restriction fragment length polymorphism
[8] Amplified fragment length polymorphism
[9] Temperature gradient gel electrophoresis
[10] Constant denaturing gel electrophoresis
[11] Heteroduplex analysis
[12] Protein truncation tests
[13] phospholipid fatty acid
[14] Fluorescence in situ hybridization
[15] Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies
[16] Catalyzed reporter deposition fluorescence in situ hybridization
[17] Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization
[18] Recognition of individual genes
[19] Leonard lerman and stuart Fischer
[20] State University of New York
[21] Gerard Muyzer
[22] Archaea

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.1.2]

خواص مختلفی در تغییر حالت مولکول های DNA ایجاد می کند که اساس چندشکلی در گروه های میکروبی در DGGE است (Huges et al. 2001; Tabatabaei et al. 2009;Tabatabaei et al. 2010). اخیرا مطالعات نشان داده‌اند که DGGE برای ژن های عملکردی (به عنوان مثال ژن های موثر در احیای گوگرد، تثبیت نیتروژن و اکسیداسیون آمونیوم) نیز می تواند اطلاعات مناسبی در ارتباط با عملکرد میکروبی و روابط ژنتیکی آنها با گیاه یا جانور را به طور همزمان فراهم کند. علاوه بر این، مطالعه محیط های میکروبی پیچیده ای مانند خاک، فاضلاب، پساب صنعتی نظیر پساب کارخانه روغن نخل با استفاده از DGGE امکان پذیر شده است. برای مثال، غالبیت باکتری *Methanosaeta concilii* در فرایند تولید متان از دانه روغنی به کمک DGGE مورد ردیابی قرار گرفته است (Tabatabaei et al. 2010 ; Tabatabaei et al. 2009). DGGE نوع خاصی از الکتروفورز است که در آن حرارت ثابت (حدود ۶۰ درجه سانتی گراد) و غلظت متفاوتی از مواد شیمیایی دواسرشت کننده استفاده شده و محصولات PCR بر اساس روش Muyzer and Smalla (1998) معمولا در ژل عمودی حاوی ۸ درصد پلی اکریل آمید (w/v) با بازه ضخامتی ۵-۱ میلی متر بارگیری می شود. شیب واسرشتی ژل اکریل آمید به دست آمده در حضور اوره و فرمامید به صورت افزایشی از صفر در بالای ژل تا صد درصد در پایین ژل فراهم می‌گردد. پس از الکتروفورز، محصولات PCR به صورت باندهای مجزا از هم در ژل قرار گرفته و توسط اتیدیوم بروماید و یا نیترات نقره رنگ آمیزی می شوند. زمانی‌که توالی‌های ژن‌های هدف به حد آستانه ذوب خودشان رسیدند، دو رشته DNA از هم باز می شوند. جفت باز آدنین و تیمین، و سیتوزین و گوانین از لحاظ شیمیایی بطور متمایز ذوب می شوند. در واقع پیوند هیدروژنی بین جفت بازها با وساطت حرارت دستگاه و افزایش شیب واسرشت توسط مواد شیمیایی واسرشت کننده (اوره و فرمامید) شکسته می شود. به طور کلی، قطعات DNA غنی تر از GC پایدارتر بوده و تا رسیدن به غلظت های بالاتر دو رشته ای باقی خواهند ماند و این دورشته ای ماندن تا زمانی که میزان درصد لازم از عوامل ذوب کننده در طول ژل نرسد همچنان باقی می ماند. قطعه دو رشته ای بهتر می تواند در طول ژل اکریل آمید مهاجرت کند و این در حالی است که مولکول های DNA واسرشت شده، با سرعت کمی حرکت می کنند و یا اینکه در ژل متوقف می شوند. هر گونه تنوع توالیDNA در این حوزه، ذوب در دماهای مختلف را منجر شده و در نتیجه باعث مهاجرت رشته های مختلف به موقعیت های مختلف در ژل می گردد (شکل ۲ و ۴). این امر به DGGE قدرت تفکیک و ردیابی جهش در توالی‌ها را بدون اینکه قبلا از این توالی ها آگاهی داشته باشیم، فراهم می کند. به همین دلیل از این روش علاوه بر مطالعه تنوع ژنتیکی، در تشخیص جهش در موجودات زنده نزدیک و مرتبط به هم نیز استفاده می شود (Tabatabaei et al. 2009). لازم به یادآوری است که با دانستن جایگاه توالی خاصی از یک یا چند میکروب در ژل اکریل آمید می توان به وجود یا عدم وجود آنها در نمونه های میکروبی نیز پی برد و در مطالعات گوناگون با اهداف مختلف میکروبیولوژیکی و زیست محیطی از الگوهای به دست آمده بهره برداری نمود (شکل ۳). برای مثال، واکنش زنجیره ای پلیمراز معمولی در DNA های بدست آمده از نمونه های زیست محیطی، می تواند الگوهای متفاوت توالی DNA را که نشان دهنده بسیاری از عوامل غالب میکروبی اند، تولید کند. با این حال، از آنجا که محصولات واکنش PCR در مطالعات متاژنومی از لحاظ اندازه (جفت باز) مشابه هستند، جداسازی متعارف چنین محصولاتی توسط الکتروفورز ژل آگارز معمولی فقط یک تک باند را منجر می شود که نمی‌تواند تشریح شود. الکتروفورز DGGE می تواند با جدا کردن این محصولات بر اساس تفاوت در محتوای توالی های DNA با وساطت مواد شیمیایی واسرشت کننده این مسئله را برطرف نماید.

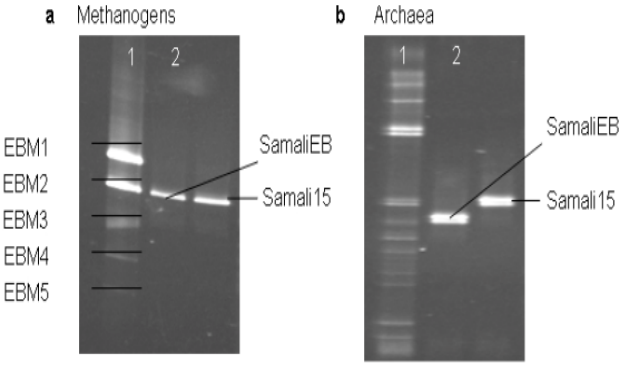
مزایا و معایب DGGE

روش های الکتروفورز وابسته به توالی[1] مانند DGGE، ابزارهای مولکولی هستند که به مطالعه جمعیت های میکروبی در محیط های آبی و خاک، فاضلاب، مخازن نفت، مخازن تخمیر مواد غذایی، دستگاه گوارش، روده و غیره می پردازند (Teske et al. 1996; Watanabe et al. 2000; Smalla et al. 2001; Possemiers et al. 2002; Gomes et al. 2003; Kim et al.2007)

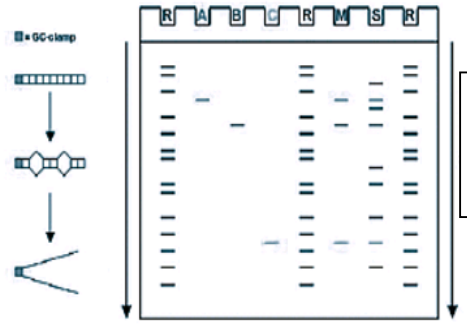
[1] Sequence dependent electrophoresis (SDE)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

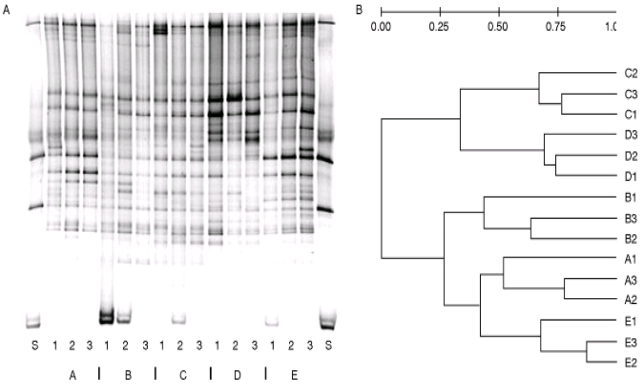
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.1.2]



شکل ۲- انگشت نگاری مبتنی بر PCR-DGGE متانوژن‌ها در ژل اکریل آمید ۴۰ تا ۶۰ درصد و آرکئا در ژل اکریل آمید ۵۰ تا ۶۰ درصد با استفاده از آغازگرهای متانوژنی و آرکئایی. چاهک ۱ (a): متانوژن‌های موجود در بیورآکتور بی هوازی، چاهک ۱ (b): آرکئاهای موجود در بیورآکتور بی هوازی، چاهک ۲ و۳: (SamaliEB and Samali15) *Methanosaeta concilii*.



شکل ۳- نمایش الگوی جدا شدن نوارهای DNA در روی ژل. R: الگوی مرجع، A: میکروب ۱، B: میکروب ۲، C: میکروب ۳، M: مخلوط هر سه میکروب، S: نمونه ناشناخته (گیره جی سی متصل به قطعات تکثیر شده از جدا شدن دو رشته در درون ژل جلوگیری می نماید).



شکل ۴- استفاده از الگوی قطعات تکثیر شده جامعه میکروبی نمونه های گوناگون محیطی در بررسی روابط فیلوژنتیکی میکروبهای موجود در آنها

نتایج مطالعات می تواند اطلاعاتی را در مورد تنوع میکروبی و همچنین ارزیابی پایداری جمعیت میکروبی ارائه دهد. برای مثال Xia et al. (2010) با تجزیه و تحلیل DGGE تایید کرد که جنس نیتروزوموناس دارای AOB[1] غالب در بیوفیلم بوده است. همچنین OMahony et al. (2009) برای تعیین تنوع میکروباکتری های روده میزبان در سندرم روده تحریک پذیر و بررسی نمونه های بیوپسی مخاط از بیماران سندرم روده تحریک پذیر و مقایسه آنها با مدفوع از روش DGGE استفاده کرد. در ایران نیز (Kafili et al. 2009) از تجزیه و تحلیل PCR-DGGE در شناسایی لاکتوباسیل های غالب میکروبی پنیر سنتی لیقوان ایرانی پیش از تولید بهره بردند. Long et al. (2010) از روش‌هایی مانند DGGE، TGGE و RFLP برای تجزیه و تحلیل تنوع قارچی و میکوریزی و نیز استخراج اسیدهای نوکلئیک یوکاریوتی و تعیین تنوع باکتریایی در عصاره DNA استفاده کردند. روش PCR-DGGE دارای این مزیت است که نیاز به استفاده از دانش قبلی در ارتباط با جمعیت میکروبی ندارد. در واقع این روش نوعی انگشت نگاری از ژن است که می تواند الگوی تنوع ژنتیکی را در اکوسیستم پیچیده میکروبی مانند قطعات دستگاه گوارش، خاک، رسوبات، عمق دریاها، رودخانه ها، چشمه‌های آب گرم و غشاهای زیستی بررسی کند. مزیت عمده این روش، پتانسیل آن در مشاهده چشمی و نظارت بر تغییرات رخ داده در جوامع مختلف میکروبی است که تحت اثر تغییرات و یا تیمارهای مختلف قرار دارند. این روش دارای قدرت بالایی در تفکیک سریع و کارآمد DNA های تکثیر شده با طول یکسان توسط PCR است و این قدرت تفکیک می تواند به میزان حتی یک باز باشد (Xia et al. 2010). با وجود این واقعیت که DGGE نتایجی تولید می کند که دقیق تر و قابل اعتماد تر از روش های پیشین ژل الکتروفورتیک است، با این حال دارای مشکلاتی نیز می باشد. برخی محدودیت های DGGE عبارتند از: ضعف های اجباری PCR (Wintzingerode et al. 1997) و بارگذاری با زحمت زیاد نمونه ها که تاثیری بالقوه در ارزیابی و در نتیجه شناسایی جامعه میکروبی دارد که منجر به کاهش کارایی می‌شود (Theron and Cloete 2000). همچنین تخمین زده شده است که با وجود مزایا و

[1] Ammonia-oxidizing bacteria

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.1.2]

نقاط قوت تکنیک DGGE، این تکنیک به تنهایی و بدون استفاده همزمان روش‌های دیگر چون FISH قادر به شناسایی الگوی کامل جمعیت میکروبی نخواهد بود (Muyzer et al. 1993). تنوع میکروبی منعکس شده توسط الگوهای DGGE تنها به گونه‌های غالب مربوط است؛ بنابراین بطور کامل فلور میکروبی و تعداد گونه های واقعی موجود در نمونه را نشان نمی دهد (Huaide et al. 2009). در نمونه هایی که شامل تعداد زیادی 16S rRNA مختلف هستند، در صورتی که تجزیه و تحلیل دقیق مورد نظر باشد، لازم است از آغازگرهای مشخص تری بهره گرفت. Misook et al. (2010) برای مکان یابی اگزون ۴،۲،۱ و ۵ در ژن hTERT، یکی از ژن‌های موثر در فعالیت آنزیم تلومراز، به طور جداگانه از DGGE استفاده کردند، زیرا در ژل سایر روش ها الگوهای ذوب مبهمی مشاهده می شد، در حالی‌که DGGE از آغازگرهای طراحی شده برای همان روش ها استفاده می کند. برخی از معایب عمده و یا محدودیت های متعارف مانند کم بودن سرعت عمل، پایین بودن قدرت تشخیص و دقت و صحت طبقه بندی می تواند از طریق روش های کشت مستقل برطرف شوند. یکی دیگر از نواقص آن است که هیچ استاندارد تعیین شده ای برای ژل DGGE و مقدار محصول PCR ورودی وجود ندارد. الکتروفورز DGGE همیشه می تواند توالی هایی را که در یک باز متفاوتند، جدا کند اما توالی های متفاوت در باز های متعدد به راحتی جدا نمی شوند. ویژگی های حاصل از انتخاب نمونه، استخراج DNA، رونویسی معکوس، طراحی آغازگر، شرایط PCR و پاکسازی PCR روی نتایج تکنیک DGGE تاثیر گذار است. هر مرحله از تجزیه و تحلیل مولکولی DGGE می‌تواند بر هر مرحله پایین دست تاثیر گذارد. تجزیه و تحلیل DGGE کاملاً پیچیده بوده و حساس به مشکلات PCR است و در نتیجه بایستی توجه ویژه ای به این مرحله گردد. محدودیت ها باید قبل از به کارگیری روش به خوبی درک شوند؛ با توجه به افزایش مشکلات مرتبط با DGGE، محققان به کشف روش های جدیدی که قادر به کم کردن برخی از مشکلات هستند روی آورده اند. امروزه روش TGGE[1] به عنوان تکنیکی قابل اطمینان و مناسب تر توسعه داده شده است. روش TGGE نیز مانند DGGE با بهره‌گیری از رفتار ذوب مولکول به عنوان یک روش اولیه برای جدا کردن قطعات بر روی ژل، کار می کند. تفاوت اصلی آن است که در TGGE به جای شیب شیمیایی، شیب دما استفاده می‌شود (Muyzer and Smalla 1998). T-RFLP می تواند به منظور ارائه برخی اطلاعات فیلوژنتیک در نظر گرفته شود، که در آن بر اساس تجزیه و تحلیل محدودیت قطعه می توان برخی از داده های کمی DGGE که کمتر در دسترس هستند و قابلیت تبدیل شدن به اطلاعات فیلوژنی را ندارند ، بدست آورد بعنوان مثال (Osborn et al. 2000)، (Diez et al. 2001 و Dollhopf et al. 2001) نشان دادند که T-RFLP در برخی از ژن های کاربردی که دارای اندازه قطعات ژن نامتناسب برای DGGE هستند، مناسب می‌باشد. همچنین T-RFLP ممکن است از برخی مشکلات مرتبط با آغازگر DGGE اجتناب کند. همچنین Zare-Karizi et al. (2010) در مطالعات مشابه خود از روش بررسی تنوع کنفورماسیون توالی های تک رشته ای[2] (SSCP) به دلیل ساده تر بودن مراحل کار، مقرون به صرفه و در دسترس بودن برای اسکن جهش استفاده کرده اند.

تجهیزات تجاری دستگاه

تولیدکنندگان عمده دستگاه DGGE شامل INGENY ، Bio-Rad و CBS هستند که CBS ارزان‌ترین نوع و INGENY گران‌ترین نوع را ارئه داده است. متداول‌ترین نوع مورد استفاده در موسسات تحقیقاتی و دانشگاه ها Bio-Rad است، اگرچه مشکلاتی در مدل Bio-Rad وجود دارد که تعدادی از این مشکلات عبارتند از: کیفیت ضعیف ژل (به علت عدم تحرک کافی در ژل، حالت فازی نامناسب، به وجود آمدن حباب در ژل و غیره)، شروع سریع الکتروفورز پس از بارگذاری نمونه، شکسته شدن صفحات شیشه ای ظریف آن و سایر قطعات و هزینه های بالای تعویض آنها، نیاز به برداشتن بخش های سنگین بافر سیستم DGGE برای قرار دادن ژل در آن، برداشتن ژل، اضافه کردن نمونه ها و غیره (این امر احتمال شکستن عنصر گرم کننده و خنک کننده را در طول بارگیری بافر و ژل و تمیز کردن افزایش می دهد)، تعداد محدود

[1] Temperature gradient gel electrophoresis

[2] Single strand configuration polymorphisms

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.1.2]

چاهک ورودی (این مورد برای تمام سیستم های DGGE است)، بروز خوردگی در الکترودها.

سیستم INGENY نسبت به سیستم Bio-Rad دارای مزایای بسیاری است، اما دارای معایبی نیز می باشد. این مزایا و معایب عبارتند از: عدم نیاز به حذف عنصر حرارت از مخزن بافر (این امر اجازه می دهد در تمیز کردن و بارگیری ژل حرارت داشته باشیم)، عدم نیاز به ریختن موم در پایین ژل به‌دلیل وجود فرم U شکل، حجم بسیار زیاد بافر (۱۷ لیتر) که احتمالا به ثبات درجه حرارت کمک می کند، اما تا حدودی از لحاظ آماده سازی بافر ایجاد اختلال می کند، ژل وسیع دارای گنجایش ۳۲ چاهک (متداول) و ۴۸ چاهک (کم عرض) می باشد، شیب سیستم زیاد شده است. در سیستم CBS حجم بافر ۱۸ لیتر است و می تواند ۴ ژل را نگه دارد که این موضوع می تواند در مدیریت زمان موثر باشد(Ercolini 2004).

نتیجه گیری

بر اساس مباحث مطرح شده در این بررسی می توان نتیجه گیری نمود که روش DGGE می تواند در بررسی جوامع و تنوع میکروبی موجود در نمونه های مختلف، تشخیص بیماری های میکروبی و شناسایی باکتری ها در مقیاس بزرگ استفاده شود، زیرا این روش قابلیت اجرای نسبتا ساده دارد. با در نظر گرفتن محدودیت های فعلی، DGGE روشی کارآمد و منحصر به فرد است که پل ارتباطی بسیاری از زمینه های زیست شناسی مولکولی بوده و محدودیت های آن در درجه اول مربوط به این واقعیت است که هنوز روشی نسبتا جدید به شمار می رود. بنابراین تنها پاسخ مناسب به این پیشرفت، داشتن توجه ویژه در بهبود چنین روش‌های جدیدی خواهد بود.

منابع

Allen EE, Banfield JF (2005) Community genomics in microbial ecology and evolution. Natural Review of Microbiology 3:489-498.

Amman RL, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Review of Microbiology 59:143-169.

Bey BS, Fichot EB, Dayama G, Decho AW, Norman RS (2010) Extraction of high molecular weight DNA from microbial mats. Journal of Bio Techniques 49:631-640.

Borneman J (1999) Culture-independent identification of microorganisms that respond to specified stimuli. Journal of Applied and Environmental Microbiology 65:3398-3400.

Bowler LD, Hubank M, Spratt BG (1999) Representational difference analysis of cDNA for the detection of differential gene expression in bacteria: development using a model of iron-regulated gene expression in Neisseria meningitidis. Journal of Microbiology 145:3529-3537.

Chan JW, Goodwin PH (1995) Extraction of genomic DNA from extracellular polysaccharide-synthesizing Gram-negative bacteria. Journal of Bio Techniques 18:418-422.

Coskuner G, Ballinger SJ, Davenport RJ, Pickering RL, Solera R, Head IM, Curtis TP (2005) Agreement between theory and measurement in quantificationof ammonia-oxidizing bacteria. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 71:6325-6334.

Cowan DA (2000) Microbial genomes-the untapped resource. Journal of Trends Biotechnology 18:14-16.

Creighton TE, Shortle D (1994) Electrophoretic characterization of the denatured states of staphylococcal nuclease. Molecular Biology Journal 242 (5): 670-682.

Curtis TP, Sloan WT (2004) Prokaryotic diversity and its limits: microbial community structure in nature and implications for microbial ecology. Current Opinion In Microbiology 7:221-226.

Diez B, Pedros-Alio C, Marsh L, Massana R (2001) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. Journal of Applied and Environmental Microbiology 67:2942-2951.

Dinoto A, Marques TM, Sakamoto K, Fukiya S, Watanabe J, Ito S, Yokota A (2006) Population dynamics of Bifidobacterium species in human feces during raffinose administration monitored by fluorescence in situ hybridization-flow cytometry. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 72:7739-7747.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.1.2]

Dollhopf SL, Hashsham SA, Tiedje JM (2001) Interpreting 16S rDNA T-RFLP data: Application of self-organizing maps and principal component analysis to describe community dynamics and convergence. Journal of Microbial Ecology 42:495 - 505.
Elizabeth A, Galbraith A, Antonopoulos A, Bryan A (2004) Suppressive subtractive hybridization as a tool for identifying genetic diversity in an environmental metagenome: the rumen as a model. Journal of Environmental Microbiology 6:928-37.
Ercolini D (2004) PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. Journal of Microbiological Methods 56:297-314.
Ferris MJ, Muyzer G, Ward DM, (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. Journal of Applied and Environmental Microbiology 62:340-346.
Fischer SG, Lerman LS (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. Journal of Cell 16:191-200.
Fischer SG, Lerman LS (1980) Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 77:4420-4424.
Fischer SG, Lerman LS (1983) DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. Proceedings of the National Academy of Sciences of the *United States* of America 80:1579-1583.
Gabor EM, Devries EJ, Janssen DB (2003) Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. FEMS Microbiology Ecology 44:153-163.
Gilbride KA, Lee DY, Beaudette LA (2006) Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. Journal of Microbiology Methods 66:1-20.
Gomes N, Fagbola O, Costa R, Rumjanek NG, Buchner A, Mendona-Hagler L, Smalla K (2003) Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. Journal of Applied and Environmental Microbiology 69:3758-3766.
Green CD, Simons JF, Taillon BE, Lewin DA (2001) Open systems: panoramic views of gene expression. Journal of Immunol Methods 250:67-79.
Henckel T, Friedrich M, Conrad R (1999) Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxygenase, and methanol dehydrogenase. Journal of Applied Environment Microbiol 65:1980-1990.
Huaide L, Mei L, Baojie W, Keyong J, Shan J, Shujuan S, Lei L (2009) PCR-DGGE analysis of intestinal bacteria and effect of *Bacillus* spp. on intestinal microbial diversity in kurumashrimp (*Marsupenaeus japonicus*). Chinese Journal of Oceanology and Limnology 28:808-814.
Hugenholtz P, Brett MG, Norman RP (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. Journal of Bacteriology 180:4765-4774.
Hugenholtz P, Pace NR (1996) Identifyingmicrobial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. Journal of Trends Biotechnology 14:190-197.
Huges JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannan BJ (2001) Counting the Uncoutable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. Journal of Applied and Environmental Microbiology 67:4399-4406.
Kafili T, Razavi SH, Emam Djomeh Z, Naghavi MR, Alvarez-Martin P, Mayo B (2009) Microbial characterization of Iranian traditional Lighvan cheese over manufacturing and ripening via culturing and PCR-DGGE analysis: Identification and typing of dominant lactobacilli. European Journal of Food Research 229:83-92.
Kim D, Brunt J, Austin B (2007) Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (Oncorhynchusmykiss). Journal of Applied Microbiology 102:1654-1664.
Liu Y, Whittier RF (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from pi and yac clones for chromosome walking. Journal of Genomics 25:674-681.
Long LK, Yao Q, Guo J, Yang RH, Huang YH, Zhu HH (2010) Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with five selected plant species from heavy metal polluted soils. European Journal of Soil Biology 46:288-294.
Manefield M, Andrew SW, Robert IG, Mark JB (2002) RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to phylogeny. Journal of Applied and Environmental Microbiology 68:5367-5373.
Megonigal MD, Rappaport EF, Wilson RB, Jones DH, Whitlock JA, Ortega JA, Slater DJ, Nowell PC, Felix CA (2000) Panhandle PCR for cDNA: a rapid method for isolation of MLL fusion transcripts involving unknown partner genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:9597-9602.
Mishra RN, Singla-Pareek SL, Nair S, Sopory SK, Reddy MK (2002) Directional genome walking using PCR. Journal of Biotechniques 33:830–834.
Misook Cho GA, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X, Siegel X, Bergman A, Huffman DM, Schechter CB, Wright WE, Shay JW, Barzilai N, Govindaraju DR, Suh Y (2010) Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. Proceedings of the

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.1.2]

National Academy of Sciences of the United States of America 26:1710-1717.
Morris CE, Bardin M, Berge O, Frey-Klett P, Fromin N, Girardin H, Guinebretiere MH, Lebaron P, Thiery JM, Troussellier M (2002) Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. Microbiol Molecular Biology Review 66:592-616.
Muyzer G, Smalla K, (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Journal of Genenetic Molecular Microbiology 73: 127-141.
Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Journal of Applied and Environmental Microbiology 59:695-700.
Myers RM, Maniatis T, Lerman LS (1987) Detection and localization of single base pair changes by denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Methods in Enzymology 155:501.
Myrick KV, Gelbart WM (2002) Universal fast walking for direct and versatile determination of flanking sequence. Journal of Gene 284:125-131.
Niemi RM, Heiskanen I, Wallenius K, Lindstrom K (2001) Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. Journal of Microbiology Methods 45:155-165.
Ochman H, Ayala FJ, Hartl DL (1993) Use of polymerase chain reaction to amplify segments outside boundaries of known sequences. Journal of Methods in Enzymology 218:309–321.
Omahony El, Shanahan EF, Eamonn E, Quigley MM, Julian E, Marchesi R (2009) A molecular analysis of fecal and mucosal bacterial communities in irritable bowel syndrome. Journal of Digestive Diseases and Sciences 55:392-397.
Osborn M, Moore A, Edward R, Timmis B, Kenneth N (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. Journal of Environmental Microbiology 2:39-50.
Pontes DS, Lima-Bittencourt CI, Chartone-Souza E, Amaral-Nascimento AM (2007) Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34:463-473.
Possemiers S, Verthe K, Uyttendaele S, Verstraete W (2004) PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. FEMS Microbiology and Ecology Journal 49:495-507.
Radajewski S, Webster G, Reay DS, Morris SA, Ineson P, Nedwell DB, Prosser JI, Murrell JC (2002) Identification of active methylotroph populations in an acidic forest soil by stable-isotope probing. Journal of Microbiology 148: 2331-2342.
Rappe MS, Giovannoni SJ (2003) The uncultured microbial majority. Annual Review of Microbiology 57:369-394.
Roose-Amsaleg CL, Garnier-Sillam E, Har M (2001) Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. Journal of Applied Soil Ecology18: 47-60.
Schloss PD, Handelsman J (2003) Biotechnological prospects from metagenomics. Current Opinion in Biotechnology 14: 303-310.
Schloss PD, Handelsman J (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. Journal of Applied and Environmental Microbiology 71:1501-1506.
Schloss PD, Handelsman J (2005) Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. Journal of Genome Biology 6:229.
Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, Xu BH, Uchiyama H (2002) Succession of bacterial community structure alongthe Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. Journal of Applied and Environmental Microbiology 68:5142-5150.
Shelswell KJ (2004) Metagenomics: The science of biological diversity. The Science Creative Quarterly Journal 6.
Sloan TW, Scannell JW (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99:10494-10499.
Smalla K, Wieland G, Buchner A, Zock A, Parzy J, Kaiser S, Roskot N, Heuer H, Berg G (2001) Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: Plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. Journal of Applied and Environmental Microbiology 67:4742-4751.
Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM (2004) New Strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. Journal of Applied and Environmental Microbiology 70: 4748–4755.
Tabatabaei M, Zakaria MR, Abdul Rahim R, Abdullah N, Wright A, Shirai Y, Shamsara M, Sakai K, Hassan MA (2010) Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from high-strength wastewater sludge. African Journal of Biotechnology 9:4926-4937.
Tabatabaei M, Abdul Rahim R, Abdullah R, Wright ADG, Shirai Y, Sakai K, Sulaimanh A, Hassan MA (2010) Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments. Journal of Process Biochemistry 45:1214-1225.
Tabatabaei M, Zakaria MR, Abdul Rahim R, Denis G, Wright A, Shirai Y, Abdullah N, Sakai K, Ikeno S, Mori M, Kazunori N, Sulaiman A, Hassan MA (2009) PCR-Based DGGE and FISH Analysis of Methanogens in Anaerobic Closed Digester Tank

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.1.2]

Treating Palm Oil Mill Effluent (POME). Electronic Journal of Biotechnology 12.
Tam K, Yang CH, Matsumoto MR, Crowley DE Sheppard JD (2005) Comparison of PCR-DGGE and selective plating methods for monitoring the dynamics of amixed culture population in synthetic brewery wastewater. Journal of Biotechnology Progress 21:712-719.
Teske A, Wawer C, Muyzer G Ramsing NB (1996) Distribution of sulfate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. Journal of Applied and Environmental Microbiology 62:1405-1415.
Theron J, Cloete TE (2000) Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. Crit Rev Microbiol 26:37-57.
Thomsen TR, Nielsen JL, Ramsing NB, Nielsen PH (2004) Micromanipulation and further identification of FISH-labelled microcolonies of a dominant denitrifying bacterium in activated sludge. Journal of Applied and Environmental Microbiology 6:470–479.
Urbach E et al (1999) Immunochemical detection and isolation of DNA from metabolically active bacteria. Journal of Applied and Environmental Microbiology 65: 1207-1213.
Watanabe K, Watanabe K, Kodama Y, Syutsubo K, Harayama S (2000) Molecular characterization of bacterial populations in petroleum-contaminated groundwater discharged from underground crude oil storage cavities. Journal of Applied and Environmental Microbiology 66:4803-4809.
Wintzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Review 21:213-29.
Wintzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Review 21:213-229.
Xia S, Li J, Wang R, Li J, Zhang Z (2010) Tracking composition and dynamics of nitrification and denitrification microbial community in a biofilm reactor by PCR-DGGE and combining FISH with flow cytometry. Biochemical Engineering Journal 49:370-378.
Zare-Karizi SH, Hosseini-Mazinani SM, Khazaei-Koohpar Z, Seifati SM, Shahsavan-Behboudi B, Akbari MT, Koochmeshgi J (2010) Mutation spectrum of phenylketonuria in Iranian population. Molecular Genetics and Metabolism 102:29-32.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.4.1.2]