تکثیر دایره غلتان روشی جهت شناسائی پرندگان (مطالعه موردی: کبک (*Alectoris chukar*

سحر جواهری طهرانی[۱]، منصور علی آبادیان[۱،۲]* و محمد جواد نجف زاده[۳]

[۱]مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

[۲]مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه پژوهشی نوآوریهای جانورشناختی

[۳]مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۱۹

چکیده

ماکیان سانان در فهرست مورد تهدیدترین پرندگان محسوب می شوند که شکار و بهره برداری از آنها به منظور اهداف متفاوتی از جمله: غذا، تفریح و یا اهداف تجاری صورت می گیرد. شکار و بهره برداری بیش از حد سبب شده است که درصد بالایی از گونه های ماکیان سانان (۲۶/۴٪) آنها به عنوان مورد تهدید با خطر انقراض در فهرست سرخ IUCN قرار بگیرند. از اینرو به منظور اقدامات موثر حفاظتی و همچنین جلوگیری از شکار بی رویه ماکیان سانان و اطمینان از بقای آنها به معرفی روش تکثیر دایره غلتان (Rolling Circle Amplification) به عنوان روشی مطمئن و سریع جهت شناسایی پرنده شکار شده توسط شکارچیان متخلف می پردازیم. در این روش کاوشگرهای اختصاصی براساس تفاوت تنها در یک نوکلئوتید از ناحیه ژن مورد نظر برای گونه ی هدف طراحی می شوند که در این مطالعه طراحی کاوشگر بطور موردی برای گونه کبک (*Alectoris chukar*) صورت پذیرفت. کاوشگر های اختصاصی پس از هیبریداسیون با DNA به شکل یک مولکول بسته درآمده و با اتصال به هدف و تکثیر در شرایط تک دمایی مورد ارزیابی قرار می گیرند. محصول تکثیر یافته به راحتی روی ژل آگارز یا پس از اضافه نمودن رنگ‌های فلورسنت به طور مستقیم زیر نور UV قابل مشاهده است. بدین ترتیب، با توجه به آسان بودن عملیات آزمایش RCA و عدم نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی خاص، این روش ابزار قدرتمندی را جهت شناسایی پرندگان مورد شکار از جمله: کبک، قرقاول و حل مسائل مدیریتی و حفاظتی آنها فراهم می نماید.

واژه های کلیدی: کاوشگر های قفلی، تکثیر دایره غلتان (RCA)، ماکیان سانان، پرندگان مورد شکار، کبک

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۳۸۷۹۵۵۰۷ ، پست الکترونیکی: aliabadi@ferdowsi.um.ac.ir

مقدمه

شکار و از بین رفتن زیستگاه ها از جمله عوامل اصلی هستند که سبب کاهش جمعیت ها در میان بسیاری از گونه ها شده اند (۱۲). کشتار بی رویه، مهمترین عامل انقراض گونه ها در ماقبل از تاریخ بوده است که انسان ها در طی توسعه ی محدوده زندگیشان روی کره زمین مسبب آن بوده اند و امروزه همچنان به عنوان تهدیدی بسیار جدی باقی مانده است (۱۸). راسته ماکیان سانان شامل ۸۱ جنس و ۲۸۴ گونه می باشد (۷،۳۶). اعضای این راسته، مهمترین گروه پرندگان در معرض تهدید می باشند که بهره برداری مستقیم از آنها به منظور اهداف متفاوتی از جمله: غذا، پرورش آنها به عنوان حیوانات اهلی و یا اهداف تجاری و ... صورت می گیرد (۱۸). در طی چند دهه گذشته استفاده از گوشت شکار به یکی از نگرانی های جدی بشری تبدیل گردیده است، چراکه شکار در زمره یکی از عوامل موثر در

انقراض جمعیت های حیات وحش فهرست گردیده است. بر اساس گزارشات اخیر اتحادیه بین‌المللی حفاظت از محیط زیست (IUCN) شکار و بهره برداری بیش از حد درصد بالایی از گونه های ماکیان سانان (۲۶/۴٪) را در معرض تهدید با خطر انقراض در فهرست سرخ قرار داده است (۱).

شناسایی صحیح گونه از اساسی‌ترین نیازهای زیست شناسی حفاظت می‌باشد (۲۵) و اکثر آرایه شناسان اتفاق نظر دارند که گونه ها حقیقی و مهم هستند و گاهی اوقات تشخیص آنها بی نهایت دشوار می باشد (۳۵). با ایجاد پایگاه داده های ژنی (Gen Bank) و پروتئینی محققین به کمک علم نوپای بیوانفورماتیک روش هایی بسیار دقیق تر، اختصاصی تر و سریع تر از روش های متداول مولکولی را در علوم تشخیصی جهت شناسایی گونه ها ارائه نمودند (۴۶،۴). از جمله روش هایی که امروزه توسط محققین بسیار مورد توجه قرار گرفته است روش های هم دمایی (Isothermal) است. در این روش ها بدون نیاز به اعمال تناوب دمایی تکثیر DNA امکان پذیر می گردد. یکی از این روش ها، روش تکثیر دایره غلتان (RCA:Rolling Circle Amplification) می باشد که به دلیل اختصاصی بودن فوق العاده بالای آن بسیار مورد توجه است. لذا از کاوشگر قفلی (Padlock probe) برای شناسایی منطقه خاصی از ژنوم موجود زنده استفاده می شود و چون قالبی بسته در اتصال به DNA هدف ایجاد می کند امکان تکثیر توالی غیر اختصاصی را نزدیک به صفر می رساند (۱۴، ۲۶، ۳۴). این روش جهت شناسایی بسیاری از گونه های بیماری‌زا بخصوص گونه های قارچ (۹، ۲۹،۲۷)، ویروس و باکتری مورد استفاده قرار گرفته است و هنوز تاکنون بدلیل غنی نبودن بانک ژنی در ارتباط با همه ی گونه ها، خصوصا در مورد گونه های جانوری بزرگ جثه اعمال نشده است. لذا، به منظور حل مسائل در ارتباط با شناسایی گونه در پرندگان قابل شکار از جمله: کبک، قرقاول، بلدرچین و در راستای بکارگیری آن در دستگاه های اجرایی کشور مانند سازمان حفاظت محیط زیست و دامپزشکی به معرفی روش مولکولی RCA می پردازیم. همچنین، با توجه به آنکه کبک یکی از گونه های قابل شکار و متداول در طبیعت ایران بوده و همه ساله کارشناسان دستگاه های فوق الذکر برای شناسایی آن از گونه های اهلی بخصوص در مناطق دوردست و فاقد تجهیزات ازمایشگاهی پیشرفته دچار مشکل می باشند، این روش می تواند با کمترین تجهیزات آزمایشگاهی کارشناسان را در این امر یاری دهد. در این راستا گونه ی کبک (*Alectoris chukar*) به عنوان گونه مدل در جهت طراحی کاوشگر قفلی با توجه به اهمیت حفاظتی و شکار بی رویه آن مورد بررسی قرار گرفت.

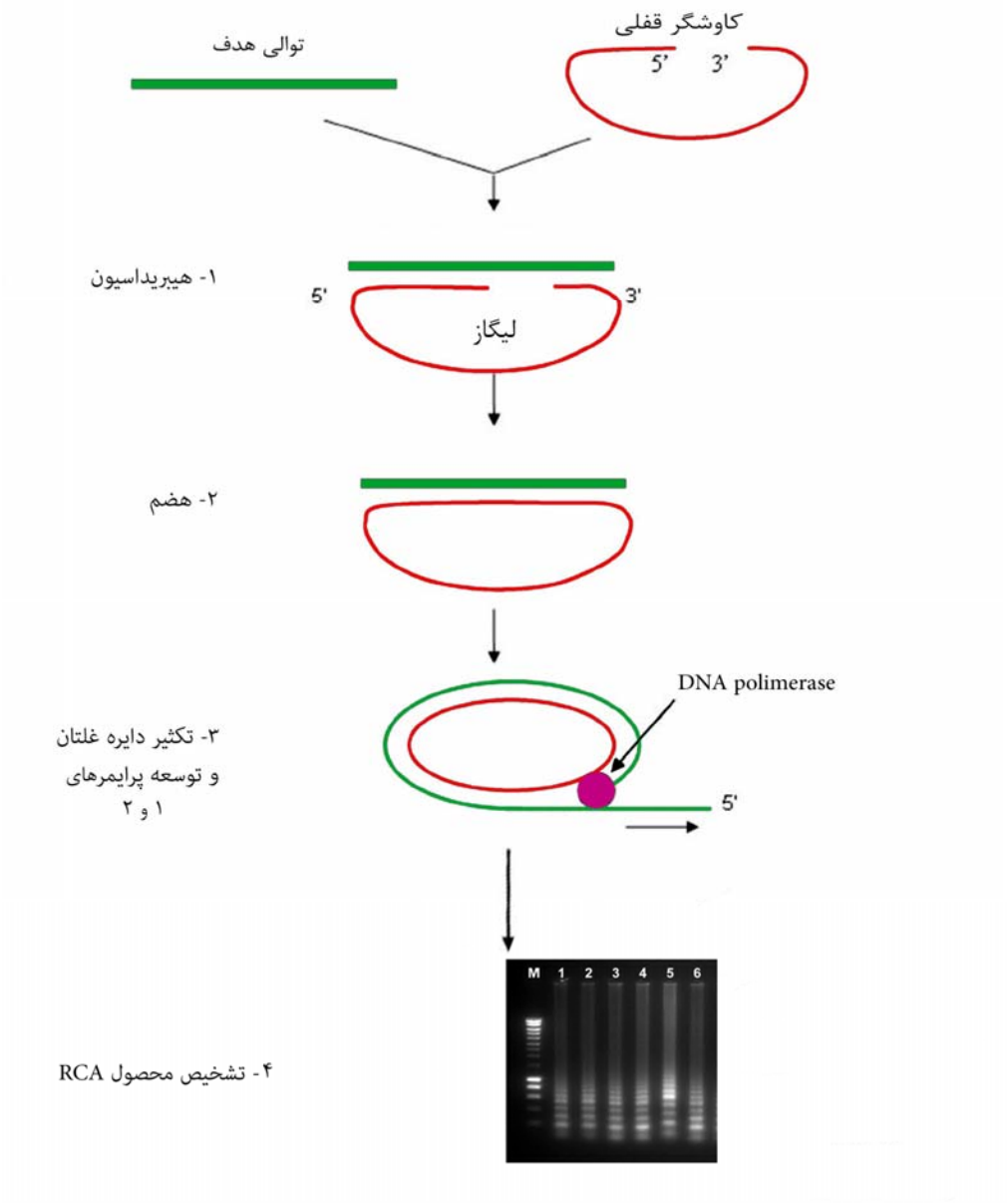
روش تکثیر دایره غلتان (RCA) : روش تکثیر دایره غلتان (RCA) روش تکثیر DNA در شرایط هم دمایی و بطور اختصاصی و حساس جهت شناسایی سریع مولکولی میکروارگانیسم ها می باشد (۲۹) که در دهه ی اخیر توجه زیادی را به خود جلب نموده است (۲۱). فن آوری RCA بطور طبیعی دارای یک محدوده ی پویای وسیع می باشد و شیوه ای ساده و قوی است که یک زمینه جهانی را برای بومی کردن مولکولهای متنوع بطوریکه دارای عملکرد آنتی ژنیکی یا توالی نوکلئیک اسیدی باشند، را فراهم می نماید (۱۴). RCA خصوصا ابزار مفیدی برای تشخیص گونه های نزدیک به هم یا ژنوتیپ های درون گونه ها می باشد که ممکن است فقط در یک نوکلئوتید با هم تفاوت داشته باشند (۳۷). این روش بر اساس همانند سازی یک DNA تک رشته ای کوتاه حلقوی (۱۳،۲۴،۲۸) توسط آنزیم های DNA پلیمراز و در دمای ثابت و شرایط آزمایشگاهی می باشد (۴۱) که در اواسط سال ۱۹۹۰ توسط نیلسون کشف شده است (۸،۳۰، ۱۹). در این روش از کاوشگرهای قفلی استفاده می شود و توسعه ی کاوشگرهای RCA برای تشخیص گونه و یا گروهی از گونه ها به حضور تعداد کافی توالی ها (داده ها) و پلی مورفیسم های مفید مخصوص گونه ای در ژن مورد نظر برای شناسایی گونه

بطور صحیح نیازمند است (۶). یک کاوشگر قفلی، الیگونوکلئوتیدی طویل (در حدود bp ۱۰۰) می باشد (۴۱) که شامل (الف) یک انتهای ′۵ فسفریله شده، (ب) یک ناحیه ی رابط شامل مناطقی برای اتصال پرایمرهای اختصاصی RCA (پرایمرهای ۱ و ۲؛ که توسط حروف بزرگ حجیم نشان داده شده اند) و همچنین مناطق رابط غیراختصاصی (توسط حروف کوچک حجیم نشان داده شده اند)، و (ج) یک انتهای ′۳ می باشد. توالی های انتهایی ′۳ و ′۵ کاوشگر مکمل با انتهای ′۳ و ′۵ توالی هدف بطور معکوس می باشند (۴۰،۴۶). گروه های فسفات در انتهای ′۵ مولکول ها برای هضم آنزیمی مورد نیاز است (۳۱). در این روش تکثیر، انتهای ′۳ و ′۵ رشته های کاوشگرها کنار یکدیگر در رشته هدف می چسبد و به حلقوی شدن مولکول پس از هضم می انجامد. واکنش هضم، امکان تشخیص موثر را درمیان واریانت های توالی ها امکان پذیر می نماید. از آنجائیکه آنزیم DNA لیگاز دو سر کاوشگر را در صورت تطابق کامل با توالی هدف قفل می کند، می تواند برای قابلیت تشخیص پلی مورفیسم های نوکلئوتیدی منفرد بطور موثری مورد استفاده قرار گیرد (۴۲،۴۳،۴۴،۴۶). سپس این مولکول حلقوی می تواند در دمای ثابت به کمک آنزیم DNA پلیمرازی که فاقد فعالیت اگزونوکلئازی است، تکثیر یابد. محصول بدست آمده به نوبه خود می تواند توسط آغازگر بعدی مورد استفاده قرار گرفته و بدین ترتیب، تکثیر DNA بصورت دنباله وار انجام گردد. درنهایت، محصول تکثیر یافته به راحتی روی ژل آگارز یا پس از اضافه نمودن رنگ های فلورسنت بطور مستقیم زیر نور UV قابل مشاهده است (شکل ۱) (۱۳). به دلیل جفت شدن دقیق نوکلئوتیدها، کاوشگرهای قفلی قادر به تشخیص جهش های نقطه ای منفرد نیز هستند (۵،۳۱). روش RCA از یک آنزیم DNA پلیمراز جهت تکثیر پیوسته از یک الگوی DNA حلقوی در دمای ثابت پایین برای تولید یک مولکول طویل DNA با توالی های تکراری از الگوی حلقوی استفاده می کند (۲). دزوکسی نوکلئوتیدهای اضافه شده به واکنش توسط آنزیم DNA پلیمراز سبب توسعه ی پرایمرهای متصل به توالی تک رشته ای حلقوی الگو می شوند (۳۲). RCA شامل یک پرایمر رفت است که به کاوشگر قفلی متصل شده و سبب شروع واکنش RCA می شود، و همچنین شامل یک پرایمر برگشت نیز می باشد که به توالی های تکرارشونده DNA تک رشته ای حاصل از واکنش اولیه ی RCA متصل می شود. سرانجام، تعداد نسخه های زیادی از قطعات DNA تشکیل می شوند (۳۲،۴۲،۴۳). در مرحله ی اگزونوکلئازیز کاوشگرهای غیر حلقوی حذف می شوند، درحالیکه کاوشگرهای حلقوی توسط پرایمرهای عمومی تکثیر می شوند (۳۸). از طریق افزایش دمای هیبریداسیون و کوتاه کردن طول بازوی ′۳ (پایین تر از دمای واکنش)، تشخیص پلی مورفیسم های نوکلئوتیدی منفرد (SNPs) می تواند بیشتر بهبود یافته (۱۰،۴۳) و مقادیر دقیقی از محصول RCA بسته به مقدار دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات های اضافه شده به مخلوط واکنش حاصل گردد (۳۲). مدت زمان انجام سنجش RCA دو ساعت است (۲۹). اگرچه، زمانیکه RCA بوسیله ی PCR-real time انجام شود معمولا ۱۵ دقیقه بعد از شروع واکنش RCA یک سیگنال مثبت آشکار خواهد شد (۳۷). در نهایت، کل فرایند شامل استخراج DNA، تکثیر PCR، هضم کاوشگرهای قفلی، اگزونوکلئازیز، RCA و ژل الکتروفورز در طی یک روز کاری به اتمام خواهد رسید (۳۷).

مواد و روشها

طراحی کاوشگر قفلی: به منظور طراحی کاوشگر قفلی RCA، ابتدا بایستی ژنی با دقت کافی به عنوان توالی هدف انتخاب گردد (۴۲). ژن *COX1* میتوکندری (سیتوکروم اکسیداز زیر واحد یک) به عنوان مناسب ترین ژن برای تحقیقات شناساگرهای جانوری شناخته شده است. درواقع تکامل این ژن به اندازه ای سریع است که قادر است گونه های بسیار نزدیک به هم را نیز از هم جدا کند (۱۶). در

این راستا، کلیه ی توالی های ژن *COXI* متعلق به گونه کبک *Alectoris chukar* و گونه های نزدیک به آن (۳۷ توالی) (ضمیمه ۱) از بانک اطلاعات ژنتیکی (http://www.boldsystems.org) که یکی از پایگاه های اطلاعات ژنی و قابل استناد می باشد، جمع آوری و انتخاب گردید و سپس، توسط برنامه ویرایشی Bioedit(۱۵) و با استفاده از مدل ClustalW، کلیه ی توالی های نوکلئوتیدی ژن مورد نظر بصورت خودکار تراز بندی گردید. سپس، چندشکلی های (polymorphisms) نوکلئوتیدی حاوی اطلاعات مفید توالی های تراز بندی شده توسط برنامه Mega 5.04 (۳۹) با بررسی و مقایسه شناسایی شدند و مناسب ترین توالی که بیشترین تفاوت را در جایگاه های مشابه سایر گونه ها دارا بود تفکیک و یادداشت گردید.



شکل ۱- نمای کلی از مراحل مختلف تکثیر دایره غلتان (RCA)

ضمیمه ۱- کدهای دسترسی نمونه های ماکیان سانان استفاده شده جهت طراحی کاوشگر قفلی برای گونه *Alectoris chukar*

نام علمی گونه	کد دسترسی در بانک ژن
Alectoris chukar	JF498827
Alectoris chukar	JF498828
Alectoris chukar	JF498826
Alectoris chukar	GQ481316
Alectoris chukar	GQ481314
Alectoris chukar	GQ481315
Alectoris chukar	GQ481313
Alectoris chukar	DQ432706
Alectoris chukar	AY666409
Alectoris chukar	FJ808621
Alectoris chukar	FJ465298
Alectoris philbyi	HQ168031
Alectoris philbyi	HQ168030
Alectoris rufa	GU951807
Alectoris philbyi	FJ465299
Alectoris melanocephala	HQ168029
Alectoris melanocephala	HQ168028
Alectoris melanocephala	HQ168027
Tetraogallus altaicus	GQ482760
Francolinus francolinus	JF498851
Francolinus erckelii	JF498850
Francolinus erckelii	JF498849
Lagopus lagopus	GQ482000
Lagopus lagopus	GQ481997
Gallus gallus	JF498862
Gallus gallus	JF498861
Lagopus lagopus	GU571439
Lagopus lagopus	GU571438
Lagopus lagopus	GQ481999
Lagopus lagopus	GQ481996
Lagopus lagopus	DQ433711
Lagopus lagopus	DQ433710
Gallus gallus	GQ922621
Lagopus lagopus	GQ481998
Bonasa umbellus	DQ434343
Bonasa umbellus	AY666214
Bambusicola fytchii	GQ922636

اجرای رهیافت تکثیر دایره غلتان

هضم (Ligation): یک میکرولیتر از آمپلیکون ژن هدف همراه با دو واحد DNA لیگاز pfu (EpicentreBiotechnologies,Madison, WI,USA) و ۰/۱ میکرومول کاوشگر قفلی در بافر R×N (شامل ۲۰ میلی‌مول تریس- اسیدکلریدیک، ۲۰ میلی‌مول KCl، ده میکرومول $Mgcl_2$، ۰/۱ درصد Igepal، ۰/۰۱ میلی‌مول rATP، و یک میلی‌مول DTT) در حجم نهایی ده میکرولیتر مخلوط و واکنش هضم با یک چرخه واسرشت‌سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۵ چرخه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۴ دقیقه در ۶۳ درجه سانتی‌گراد انجام می گردد.

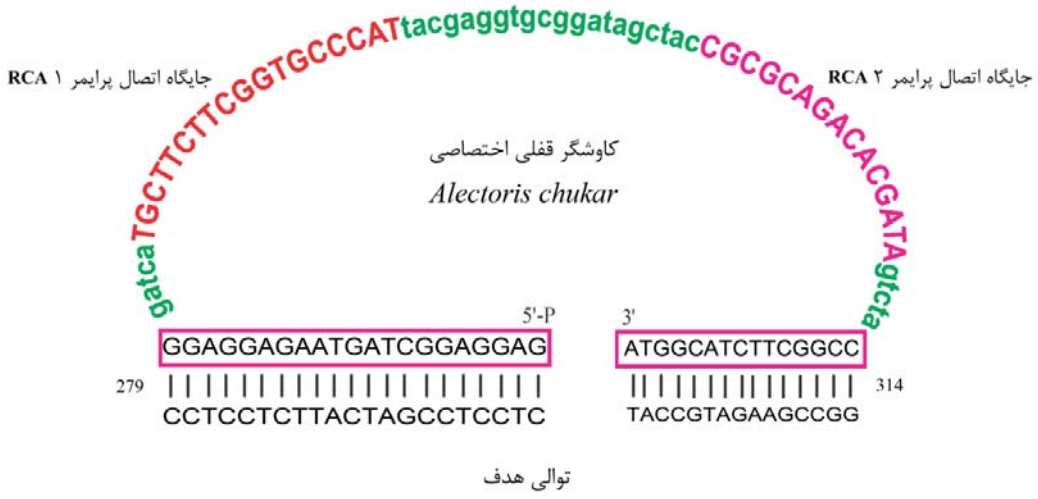
اگزونوکلئازیز (Exonucleasis): این مرحله به منظور حذف کاوشگر های قفلی هضم نشده و محصول PCR الگو و در نتیجه کاهش واکنش‌های غیردلخواه انجام می-گیرد. اگزونوکلئازیز با اضافه نمودن ۱۰ واحد از هر کدام از اگزونوکلئاز I و III (New England Biolabs, Hitchin, UK) به مخلوط هضم با واکنش نهایی ۲۰ میکرولیتر و نگهداری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و در نهایت یک مرحله ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای متوقف کردن فعالیت اگزونوکلئازها اجرا می شود. البته لازم به ذکر است که این مرحله در این رهیافت ضروری نیست و فقط احتمال تکثیر مستقل از هضم را کاهش می‌دهد. زمانیکه مرحله ی اگزونوکلئاز حذف می شود، یک باند غیر اختصاصی ظاهر می شود، اما این موضوع در واکنش RCA تداخلی ایجاد نمی کند (۳۱) .

تکثیر دایره غلتان (RCA): برای انجام این مرحله، دو میکرولیتر از محصول هضم با هشت واحد Bst DNA پلی مراز(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)، ۴۰۰ میکرومول ($\mu mol\ l^{-1}$) از مخلوط دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات و ده پیکومول از هرکدام از کاوشگرهای RCA مخلوط شده و با آب دیونیزه سترون به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر رسانده شده و باندهای کاوشگر با نگهداری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه تکثیر می شوند.

آنالیز داده ها: آمپلیکون های RCA، به طرق مختلف از جمله: فلورسانس (۳۸)، radio labeling (۳)، UV absorbance (۲۱) و ژل الکتروفورز (۳۷) تشخیص داده می شوند. ساده ترین روش، الکتروفورز ژل با استفاده از ژل آگارز ۱٪ به منظور تایید اختصاصی بودن اتصال کاوشگر-هدف می باشد. واکنش‌های مثبت به صورت الگوهای نردبانی مشاهده می‌شوند، در حالی‌که در واکنش-های منفی هیچ الگویی دیده نمی‌شود.

نتایج

مرحله ی طراحی کاوشگر قفلی حساس ترین مرحله روش RCA می باشد چرا که در این مرحله با بررسی دقیق تفاوت ها در توالی نوکلئوتیدی، بهترین ناحیه ژن از لحاظ تساوی موقعیتی با بالاترین تفاوت انتخاب می گردد. ساختار کاوشگر قفلی طراحی شده برای گونه ی کبک *Alectoris chukar* در شکل ۲ به تصویر کشیده شده است. برای اطمینان از اتصال بهینه کاوشگرها به DNA های الگو، کاوشگر با کمترین ساختار ثانویه طراحی شد و درجه ذوب (Tm) ۲۱-۲۳ جفت‌باز انتهای ′۵، نزدیک یا بالای دمای هضم (۶۳ درجه سانتی گراد) در نظر گرفته شد (۱۱،۲۸،۲۹). همچنین به جهت اینکه کاوشگر اختصاصی تر عمل نماید، ۱۴-۱۶ جفت‌باز در انتهای ′۳ کاوشگرها با Tm برابر ۱۰-۱۵ درجه سانتی‌گراد کمتر از دمای متوسط هضم طراحی گردید (۲۸،۲۹). اختصاصی بودن کاوشگر می تواند توسط انتخاب پلی مورفیسم ها در انتهای بازوی متصل شونده ′۳ افزایش یابد (۲۹). ناحیه ۶۳ جفت‌بازی متصل شونده کاوشگر قفلی همانند ژو و همکاران ۲۰۰۸ (۴۶) در نظر گرفته شد و اختصاصی بودن کاوشگر توسط آنالیز BLAST در بانک ژنی تایید گردید (۳۷).



شکل ۲- کاوشگر قفلی طراحی شده برای گونه ی کبک *Alectoris chukar*

بحث

کاربردهای روش تکثیر دایره غلتان: تکنولوژی RCA جهت تشخیص مولکولی و استفاده فارماکوژنومیک نوید دهنده می باشد (۲۱). تا کنون، عمدتا جهت تشخیص ویروس ها (۳۳،۴۴) و باکتری ها (۴۰) مورد استفاده قرار گرفته است. همچنین، روش RCA بطور موفقیت آمیزی برای برخی گونه های قارچی بکار گرفته شده است (۱۱،۲۸،۳۷،۲۲،۴۶). پتانسیل RCA جهت شناسایی توالی های نوکلئیک اسیدی هدف، آنتی بادی ها و آنتی ژن ها در نمونه های کلینیکی در مطالعات متعددی نشان داده شده است (۸). همچنین، برای ارزیابی های پروتئومیک (۸،۲۳) و جهت تشخیص دقیق آلرژن ها در غذا (۱۹) مورد استفاده قرار گرفته است. به علاوه، این روش برای تشخیص پلی مورفیسم های نوکلئوتیدی منفرد (SNPs) درون قطعات DNA، استفاده می شود که اساسی را برای تشخیص بیماری های مختلف تشکیل می دهد (۳۲).

مزیت ها و محدودیت ها: روش RCA دارای مزیت های متعددی در مقابل دیگر روش های تکثیر می باشد، از جمله شامل: حساسیت (۸،۳۲،۶،۲۹)، اختصاصیت، سرعت بیشتر (۱۱،۲۹)، هزینه کمتر (۸،۲۹)، میزان سادگی (آسانی اجرا نسبت به سایر روش ها) (۱۱)، بازده بالا (۴۵)، قابلیت انعطاف (۲۰) می باشد. RCA نیازمند تجهیزات خیلی تخصص یافته ای نمی باشد و جهت شناسایی های روزمره یا چندگانه توسعه یافته است (۶). RCA تکرار پذیر می باشد، بنابراین شانس نتایج مثبت کاذب را کاهش می دهد (۲۸،۲۹). RCA همچنین تحت شرایط با دمای ثابت انجام می شود و نیازمند چرخه های حرارتی نمی باشد (۲،۱۹،۳۲). به علاوه، RCA می تواند بوسیله ی تعداد زیادی از آنزیم های DNA پلیمراز متفاوت اجرا شود که در مقایسه با PCR که فقط آنزیم های با ثبات در اثر حرارت برای آن بکار می رود، مزیتی دیگر محسوب می شود (۸). تفسیر نتایج آسان و براساس نتایج مثبت یا منفی است (۴۳). سادگی، پتانسیل چندگانه، اجتناب از مثبت کاذب و آسانی اجرا از کلیدی ترین مزایای این روش درمقایسه با دیگر روش های شناسایی محسوب می شوند (۲۱). به علاوه، تکنولوژی RCA گزینه ای سریعتر، حساس تر و به صرفه تر در مقایسه با روش های قابل دسترس براساس PCR می باشد (۴۴). مسلما، اصلی ترین مزیت RCA، در این است که می تواند تحت شرایط با دمای ثابت و با کمترین مواد معرف اجرا شود و اجتناب از نسل نتایج مثبت کاذب داریم، مشکلی که به وفور در

سنجش های براساس PCR با آن مواجه می شویم (۱۷). همه ی این ویژگی های منحصربفرد RCA، کاربرد آن را در پژوهش های متفاوت و تشخیص های مولکولی تسهیل می نماید (۲۳). محدودیت روش فوق حساس RCA این است که نیازمند تا حدی احتیاط به منظور اجتناب از آلودگی های میسر و ایجاد مثبت کاذب می باشد (۸).

نتیجه گیری

ماکیان سانان، به عنوان گروهی از پرندگان که در معرض خطر بسیار قرار دارند، نیازمند اقدامات موثر حفاظتی برای اطمینان از بقای خود می باشند. باور عمومی براین است که شکار و دیگر اشکال بهره برداری مستقیم سبب می شود که ماکیان سانان به نسبت بالایی مورد تهدید باشند (۱۸). هم اکنون روش های متعددی جهت شناسایی و تشخیص در سطوح گونه و زیر گونه قابل دسترس می باشند. با توجه به آسان بودن عملیات آزمایش RCA، می توان به صورت سیار و در هر محلی و تنها با داشتن یک بن ماری ساده این آزمایش را انجام داد و نیازمند تجهیزات آزمایشگاهی خاصی نمی باشد. به علاوه، برای تمام گونه ها و موجودات کاربرد دارد و گونه های وابسته به هم می توانند از طریق RCA بسیار دقیق تر از PCR شناسایی و تفکیک شوند، زیرا این روش با تفاوت یک نوکلئوتید هم امکان تشخیص و تکثیر اختصاصی را دارد. همچنین، کاوشگر های ساخته شده می تواند هم برای DNA و هم برای RNA استفاده شود (۳۳،۳۴). به علت چنین ویژگی های ساده و قدرتمندی، سنجش های براساس RCA، دارای جایگاه متمایزی در محدوده تشخیص های مولکولی در میان دیگر روش های تکثیر در شرایط تک دمایی را دارا می باشد (۸). از اینرو، استفاده از روش RCA به عنوان روشی ساده و کاربردی با جایگاهی متمایز در میان دیگر روش های هم دمایی، برای تشخیص DNA پرندگان مورد شکار از جمله: کبک پیشنهاد می گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه فردوسی مشهد جهت تامین منابع و حمایت مالی طرح شماره ۲/۲۴۴۳۲ به س ج ط سپاسگزاری می‌نمائیم.

منابع

1.Aiyadurai, A., 2011. Wildlife hunting and conservation in Northeast India: a need for an interdisciplinary understanding. International Journal of Galliformes Conservation, 2, 61-73.

2.Asiello, P.J., and Baeumner, A.J., 2011. Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review. Lab on a Chip, 11, 1420-1430.

3.Banér, J., Nilsson, M., Mendel-Hartvig, M. and Landegren, U. 1998. Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. Nucleic acids research, 26, 5073-5078.

4. Brown, T., 2010. Gene cloning and DNA analysis: an introduction. John Wiley & Sons.

5.Christian, A.T., Pattee, M.S., Attix, C.M., Reed, B.E., Sorensen, K.J. and Tucker, J.D., 2001. Detection of DNA point mutations and mRNA expression levels by rolling circle amplification in individual cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98, 14238-14243.

6.Davari, M., van Diepeningen, A.D., Babai-Ahari, A., Arzanlou, M., Najafzadeh, M.J., van der Lee, T.A. and de Hoog, G.S., 2012. Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using Rolling Circle Amplification (RCA). Journal of microbiological methods, 89, 63-70.

7.Del Hoyo, J., Elliot, A., and Sargatal, J., 1994. Handbook of the birds of the World. Vol. 2. New World Vultures to Guineafowl. Lynx Edicions, Barcelona.

8.Demidov, V.V., 2005. 10 years of rolling the minicircles: RCA assays in DNA diagnostics. Expert Rev Mol Diagn, 5, 477-478.

9.Deng, S., de Hoog, G.S., Pan, W., Chen, M., van den Ende, A.G., Yang, L., Sun, J., Najafzadeh, M.J., Liao, W., and Li, R., 2014. Three Isothermal Amplification Techniques for Rapid Identification of *Cladophialophora carrionii*, an Agent of Human Chromoblastomycosis. Journal of clinical microbiology, 52, 3531-3535.

10.Faruqi, A.F., Hosono, S., Driscoll, M.D., Dean, F.B., Alsmadi, O., Bandaru, R., Kumar, G., Grimwade, B., Zong, Q., and Sun, Z., 2001. High-throughput genotyping of single nucleotide polymorphisms with rolling circle amplification. BMC genomics, 2, 4.

11.Feng, P., Klaassen, C.H., Meis, J.F., Najafzadeh, M., Van Den Ende, A.G., Xi, L., and de Hoog, G., 2013. Identification and typing of isolates of *Cyphellophora* and relatives by use of amplified fragment length polymorphism and rolling circle amplification. Journal of clinical microbiology, 51, 931-937.

12.Fernandes-Ferreira, H., Mendonça, S.V., Albano, C., Ferreira, F.S., and Alves, R.R.N., 2012. Hunting, use and conservation of birds in Northeast Brazil. Biodiversity and Conservation, 21, 221-244.

13.Fire, A., and Xu, S.-Q., 1995. Rolling replication of short DNA circles. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92, 4641-4645.

14.Gusev, Y., Sparkowski, J., Raghunathan, A., Ferguson Jr, H., Montano, J., Bogdan, N., Schweitzer, B., Wiltshire, S., Kingsmore, S.F., and Maltzman, W., 2001. Rolling circle amplification: a new approach to increase sensitivity for immunohistochemistry and flow cytometry. The American journal of pathology, 159, 63-69.

15.Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series, 95-98.

16.Hebert, P.D., Cywinska, A., and Ball, S.L., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 270, 313-321.

17.Javaheri Tehrani, S., Aliabadian, M., Fata, A., and Najafzadeh, M.J., 2014. Rolling Circle Amplification (RCA): an approach for quick detection and identification of fungal species. Journal of Mycology Research, 1, 55-62.

18.Keane, A., Brooke, M.d.L., and McGowan, P., 2005. Correlates of extinction risk and hunting pressure in gamebirds (Galliformes). Biological Conservation, 126, 216-233.

19.Kobori, T., and Takahashi, H., 2014. Expanding possibilities of rolling circle amplification as a biosensing platform. Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry, 30, 59.

20.Kong, F., Tong, Z., Chen, X., Sorrell, T., Wang, B., Wu, Q., Ellis, D., and Chen, S., 2008. Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling-circle amplification. Journal of clinical microbiology, 46, 1192-1199.

21.Kuhn, H., Demidov, V.V., and Frank-Kamenetskii, M.D., 2002. Rolling-circle amplification under topological constraints. Nucleic acids research, 30, 574-580.

22.Lackner, M., Najafzadeh, M.J., Sun, J., Lu, Q., and de Hoog, G.S., 2012. Rapid identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* strains by using rolling circle amplification. Applied and environmental microbiology, 78, 126-133.

23.Li, N., Li, J., and Zhong, W., 2008. CE combined with rolling circle amplification for sensitive DNA detection. Electrophoresis, 29, 424-432.

24.Lizardi, P.M., Huang, X., Zhu, Z., Bray-Ward, P., Thomas, D.C., and Ward, D.C., 1998. Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. Nature genetics, 19, 225-232.

25.McCarthy, E.M., 2006. Handbook of avian hybrids of the world. Oxford University Press New York.

26.Moradi, A., Karami, A., Hagh Nazari, A., Ahmadi, Z., Soroori Zanjani, R., and Javadi, S., 2008. Comparison of the PCR and LAMP techniques in the diagnosis of salmonella infection. J Zanjan Uni Med Sci, 17, 66-77.

27.Moreira, M., Adamoski, D., Sun, J., Najafzadeh, M.J., Nascimento, M.M.F.d., Gomes, R.R., Barbieri, D.d.S.A., Glienke, C., Klisiowicz, D.d.R., and Vicente, V.A., 2015. Detection of *Streptococcus* mutans using padlock probe based on Rolling Circle Amplification (RCA). Brazilian Archives of Biology and Technology, 58, 54-60.

28.Najafzadeh, M., Sun, J., Vicente, V., and De Hoog, G., 2011. Rapid identification of fungal pathogens by rolling circle amplification using Fonsecaea as a model. Mycoses, 54, e577-e582.

29.Najafzadeh, M., Dolatabadi, S., Saradeghi Keisari, M., Naseri, A., Feng, P., and de Hoog, G., 2013. Detection and identification of opportunistic *Exophiala* species using the rolling circle amplification of ribosomal internal transcribed spacers. Journal of microbiological methods, 94, 338-342.

30.Nilsson, M., Dahl, F., Larsson, C., Gullberg, M., and Stenberg, J., 2006. Analyzing genes using closing and replicating circles. Trends in biotechnology, 24, 83-88.

31.Nilsson, M., Malmgren, H., Samiotaki, M., Kwiatkowski, M., Chowdhary, B.P., and Landegren, U., 1994. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. Science, 265, 2085-2088.

32.Pang, S., Qureshi, F., Shanahan, D., and Harris, N., 2007. Investigation of the use of rolling circle amplification for the detection of GM food. European Food Research and Technology, 225, 59-66.

33.Schubert, J., Habekuß, A., Kazmaier, K., and Jeske, H., 2007. Surveying cereal-infecting geminiviruses in Germany—diagnostics and direct sequencing using rolling circle amplification. Virus research, 127, 61-70.

34.Schweitzer, B., and Kingsmore, S., 2001. Combining nucleic acid amplification and detection. Current opinion in biotechnology, 12, 21-27.

35.Shaffer, H.B., and Thomson, R.C., 2007. Delimiting species in recent radiations. Systematic Biology, 56, 896-906.

36.Sibley, C.G., and Ahlquist, J.E., 1990. The phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution. Yale University Press.

37.Sun, J., Najafzadeh, M., Zhang, J., Vicente, V., Xi, L., and de Hoog, G., 2011. Molecular identification of *Penicillium marneffei* using rolling circle amplification. Mycoses, 54, e751-e759.

38.Szemes, M., Bonants, P., de Weerdt, M., Baner, J., Landegren, U., and Schoen, C.D., 2005. Diagnostic application of padlock probes—multiplex detection of plant pathogens using universal microarrays. Nucleic Acids Research, 33, e70-e70.

39.Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution, 28, 2731-2739.

40.Tong, Z., Kong, F., Wang, B., Zeng, X., and Gilbert, G.L., 2007. A practical method for subtyping of *Streptococcus agalactiae* serotype III, of human origin, using rolling circle amplification. Journal of microbiological methods, 70, 39-44.

41.Tsui, C., Woodhall, J., Chen, W., Lévesque, C.A., Lau, A., Schoen, C.D., Baschien, C., Najafzadeh, M.J., and de Hoog, G.S., 2011. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. IMA fungus, 2, 177-189.

42.Tsui, C.K., Wang, B., Schoen, C.D., and Hamelin, R.C., 2013. Rapid Identification and Detection of Pathogenic Fungi by Padlock Probes. Laboratory Protocols in Fungal Biology, pp. 505-517. Springer.

43.Tsui, C.K., Wang, B., Khadempour, L., Alamouti, S.M., Bohlmann, J., Murray, B.W., and Hamelin, R.C., 2010. Rapid identification and detection of pine pathogenic fungi associated with mountain pine beetles by padlock probes. Journal of microbiological methods, 83, 26-33.

44.Wang, B., Potter, S.J., Lin, Y., Cunningham, A.L., Dwyer, D.E., Su, Y., Ma, X., Hou, Y., and Saksena, N.K., 2005. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification. Journal of clinical microbiology, 43, 2339-2344.

45.Wang, Q., Yang, C., Xiang, Y., Yuan, R., and Chai, Y., 2014. Dual amplified and ultrasensitive electrochemical detection of mutant DNA Biomarkers based on nuclease-assisted target recycling and rolling circle amplifications. Biosensors and Bioelectronics, 55, 266-271.

46.Zhou, X., Kong, F., Sorrell, T.C., Wang, H., Duan, Y., and Chen, S.C., 2008. Practical method for detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. by use of rolling-circle amplification. Journal of clinical microbiology, 46, 2423-2427.

Rolling Circle Amplification as a method for identification of birds (Case study: *Alectoris chukar*)

Javaheri Tehrani S.[1], Aliabadian M.[1,2] and Najafzadeh M.J.[3]

[1]Biology Dept., Faculty of Science, Ferdowsi University, Mashhad, I.R. of Iran

[2]Research Department of Zoological Innovation (RDZI)., Applied Zoology Research group, Ferdowsi University, Mashhad, I.R. of Iran

[3] Parasitology and Mycology Dept., Medical Sciences University, Mashhad, I.R. of Iran

Abstract

The Galliformes are one of the most threatened groups of birds which hunting and other forms of exploitation are applying for different purposes such as: food preparation, entertainment or other commercial purposes. Hunting and over exploitations have been leading that the high percentage of Galliformes species (26.4%) are placed as threatened with extinction in the IUCN Red List. Therefore, in order to take effective conservation actions and preventing of over hunting of Galliformes and also to ensure their survival we introduce the RCA as a certain and quick method to identify the gamebirds by offending hunters. In this method, specific probes are designed for *Alectoris chukar* based on differences in nucleotide regions of the cytochrome c oxidase subunit I gene. Specific probes created a closed molecule after hybridization with DNA and were evaluated by attaching to the target and amplification in isothermal condition. The amplification product could be easily visualized on agarose gel electrophoresis or by adding fluorescence staining in UV. In conclusion, regarding the simplicity of RCA reaction and no need to special laboratory instruments, this method provides a strong tool for identification of gamebirds (Chukar and Pheasant) and resolve their management and conservation problems.

Key words: Padlock probes, Rolling Circle Amplification, Galliformes, Game birds, Chukar