

ارزیابی همبستگی بین کیفیت و میزان RNA ویروسی استخراج شده از شیر خام با میزان ماده خشک شیر خام به منظور شناسایی ملکولی ویروسهای روده ای براساس مدل سطح پاسخ

مسعود یاورمنش^{۱*}، علی مرتضوی^۲، محمد باقر حبیبی نجفی^۲، مرتضی عباس زادگان^۳

۱- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- اساتید گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استاد گروه مهندسی محیط زیست، دانشگاه ایالتی آریزونا

(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۱۲)

چکیده

امروزه حضور ویروسهای روده ای به عنوان عامل ایجاد بیماری در آب و بعضی از مواد غذایی به اثبات رسیده است. شیر خام جزء آن دسته از مواد غذایی است که می تواند به صورت بالقوه ناقل ویروسهای روده ای باشد. فقدان هر گونه روش مشخص به منظور بازیافت و استخراج این ویروسها از شیر خام سبب شده است تا در این پژوهش در قدم اول تاثیر میزان ماده خشک شیر خام روی کیفیت و میزان RNA ویروسی استخراج شده مورد بررسی قرار گیرد. بدین منظور براساس روشهای متداول جداسازی اجزاء و ترکیبات شیر، به طور وارونه نسبت به ساخت چهار محلول مدل شیر خام بر مبنای اجزاء و نسبتهای طبیعی شیر خام اقدام و محلولهای مدل حاصل توسط کلی فاز MS2 به عنوان بهترین ویروس مدل برای ویروس های روده ای، در غلظتهای $10^4 \times 1/3$ ، $10^2 \times 1/3$ ، $10^0 \times 1/3$ ، $10^{-2} \times 1/3$ ، $10^{-4} \times 1/3$ پلاک در هر میلی لیتر تلقیح شد. با استفاده از روش پایه فنل- تیوسیانات گوانیدین - کلروفورم نسبت به جداسازی و استخراج RNA ویروسی از محلولهای مدل شیر خام اقدام و کیفیت و میزان RNA استخراج شده تحت ۱۲ تکرار توسط دستگاه اسپکتروفتومتر نانو دراپ اندازه گیری شد. نتایج حاکی از آن بود که از محلول مدل شیر خام کامل (حاوی چربی) در غلظتهای ویروسی برابر، بیشترین میزان RNA ویروسی استخراج شده است، در حالیکه بین اجزاء محلولهای مدل، کازئین و پروتئین های آب پنیر بیشترین بازدارندگی را در استخراج RNA ویروسی دارند. همچنین بالاترین کیفیت RNA استخراج شده به منظور شناسایی ملکولی ویروس های روده ای مربوط به محلول مدل شیر خام کامل (حاوی چربی) می باشد. نتایج همچنین نشان دادند که براساس مدل های سطح پاسخ (پلی نومیال)، همبستگی بالایی بین میزان استخراج RNA ویروس با میزان ماده خشک محلولهای مدل شیر خام و غلظت تلقیح ویروس ($R=0.96$) و همچنین بین کیفیت RNA استخراج شده با میزان ماده خشک محلولهای مدل شیر خام و غلظت تلقیح ویروس ($R=0.92$) وجود دارد.

کلید واژگان: همبستگی، میزان RNA ویروس، کیفیت RNA استخراج شده، ماده خشک شیر، ویروسهای روده ای

۱- مقدمه

انتقال ویروس در انسانها می تواند از طرق مختلف برای مثال از طریق محتوی قطرات سرفه و عطسه شخص عفونی، مدفوع شخص عفونی، تماس جنسی با شخص عفونی، فرآورده های خونی شخص عفونی، تماس با حیوانات ناقل ویروس و توسط ناقلین دیگر همانند پشه و کنه صورت گیرد. امروزه مشخص شده است که آب و مواد غذایی می توانند در زمره ناقلین اصلی ویروسها قلمداد شوند، این موضوع محققین را به انجام تحقیقات دامنه دار روی تعیین ویروسهای مختلف در آب و مواد غذایی ترغیب نموده است [۱]. از میان این ویروسها، ویروسهایی که سلول های ناحیه روده را عفونی می کنند، اهمیت زیادی یافته اند، این ویروسها پس از عفونی کردن سلول های ناحیه روده، تکثیر شده و ویروسهای تکثیر شده از طریق مدفوع یا استفراغ به محیط اطراف پخش می شوند [۲]. از میان این ویروسها ویروسهای نورواک^۱ و هپاتیت A در مواد غذایی از اهمیت بیشتری برخوردارند [۳و۱].

مواد غذایی از طرق زیر می توانند آلوده شوند:

الف - تماس با مدفوع انسانی یا آب آلوده شده با مدفوع انسانی

ب - تماس از طریق دستهای آلوده به مدفوع انسانی

پ - تماس با استفراغ یا آب آلوده شده با استفراغ

ت - تماس با محیط هایی که اشخاص عفونی در آن زیست می کنند.

ث - عطر و سرفه انسان های عفونی

تاکنون هیچ نشانه ای حاکی از انتقال آلودگی از طریق تماس حیوانی (مستقیم و غیر مستقیم) و یا محصولات مشتق شده از حیوانات گزارش نشده است اما گمان می رود که محصولات حیوانی مانند شیر خام می توانند در زمره ناقلین قرار گیرند [۱].

شیر امولسیون حاوی ترکیبات مختلف محلول و نامحلول می باشد، وجود ترکیبات مختلف در شیر به همراه طیف وسیع میکروارگانیسم های آن، خالص سازی و شناسایی انترو ویروسها^۲ را از آن دشوار می سازد، به همین دلیل با وجود مطالعات وسیع صورت گرفته روی شناسایی انتروویروسها در آب تا به حال هیچ گونه کار تحقیقاتی مشخصی در این مورد صورت نگرفته است، این مشکلات به همراه عدم شناخت و

1. Norwalk virus
2. Enterovirus

اطلاع کافی از نحوه قرار گیری انتروویروسها در شیر (سرم، چربی، کازئین) خالص سازی انتروویروسها را از شیر خام دچار اشکال می نماید [۴، ۵ و ۶]. لذا باید قبل از شناسایی و خالص سازی انتروویروسها در شیر خام نسبت به شناسایی دقیق اثرات متقابل ویروس با اجزاء شیر اقدام و به دنبال آن روشهای مختلف آماده سازی نمونه برای دستیابی به ویروسها در شیر مورد آزمون قرار گیرد، تا با دست یابی به یک روش قابل اعتماد، به صورت معمول به شناسایی انترو ویروسها دست زد.

همچنین استفاده از کلی فاژها بعنوان مدل برای ویروسها روده ای در سال های اخیر گسترش یافته است، در میان این کلی فاژ F-RNA می تواند بعنوان مدل در مشاهدات بیولوژیکی، مثل جذب ویروسی، نفوذ ویروسی، تکثیر ویروسی و ترجمه ژنوم ویروس به همراه تجمع آن و در نهایت رها سازی ویروس به کار گرفته شود [۷]. به طوریکه فاژ F-RNA با نام MS2 (ATCC-1597) یکی از اعضای اصلی سرو تیپ نوع یک می باشد که بیشترین کاربرد را در مدل سازی دارد [۸ و ۹]. این کلی فاژ به صورت ویژه به عنوان مدل یا شاخص برای ویروسهای روده ای به کار می رود زیرا ساختار فیزیکی، ترکیب و ریخت شناسی آن مشابهت زیادی به ویروسهای روده ای انسان دارد [۱۰ و ۱۱]. هدف از انجام این تحقیق ارزیابی هر گونه همبستگی ریاضی احتمالی بین میزان ماده خشک موجود در شیر خام (مدل شیر خام) و میزان و کیفیت RNA ویروسی استخراج شده از آن می باشد. نتایج حاصل از این تحقیق می تواند برای دستیابی به یک روش معمول در استخراج RNA ویروسی در شیر خام به کار گرفته شود.

۲- مواد و روشها

۲-۱- آماده سازی محلول های مدل شیر

خام

محلول های مدل شیر خام، از ترکیب اجزاء اصلی طبیعی شیر به صورت تجمعی^۱ مطابق با نسبتهای شیرخام طبیعی آماده شد (جدول ۱) محلولهای مدل به گونه ای طراحی شدند که ترتیب اضافه شدن اجزاء در هر محلول مدل به صورت وارونه با روشهای متداول جداسازی ترکیبات شیر مطابقت داشت

[۱۲]. این محلول های مدل پس از آماده سازی، توسط دستگاه هموژنایزرایکا^۲ به محلول هایی پایا و یکنواخت تبدیل شدند. محلول های مدل طراحی شده عبارت بودند از:

الف) لاکتوز

ب) لاکتوز + پروتئین های آب پنیر

پ) لاکتوز + پروتئین های آب پنیر + کازئین

ت) لاکتوز + پروتئین های آب پنیر + کازئین + چربی

۲-۲- آماده سازی کلی فاز MS2 و باکتری

میزبان

انتروباکتریوفاز MS2 و اشرشیا کلی میزبان آن براساس استاندارد ۱۶۰۱، حفاظت محیط زیست ایالات متحده آمریکا^۱ به ترتیب زیر آماده شد [۱۳].

۲-۲-۱- آماده سازی انتروباکتریوفاز MS2

به منظور آماده سازی انتروباکتریوفاز MS2 از یک عدد ویال^۲ حاوی کشت خالص انتروباکتریوفاز MS2 (ATCC#15597-B1) استفاده شد مراحل آماده سازی کشت خالص عبارت بودند از:

الف) افزودن آب مقطر به ویال حاوی کشت خالص انتروباکتریوفاز MS2.

ب) آماده سازی ۳۰ میلی لیتر محیط کشت TSB^۳ حاوی باکتری میزبان با ماکزیمم رشد.

پ) گرمخانه گذاری محیط کشت TSB حاوی باکتری میزبان به مدت ۲ ساعت در دمای $37 \pm 2^\circ C$.

ت) افزودن ۱ میلی لیتر از فاز خالص به محیط کشت و گرمخانه گذاری مجدد به مدت ۴ ساعت در دمای $37 \pm 2^\circ C$.

ث) عبور دادن محیط کشت از میان یک فیلتر (قطر منافذ ۰/۲۲ میکرومتر) تیمار شده با عصاره گوشت گاو^۴ (ج) نگهداری محلول عبوری فیلتر بعنوان محلول حاوی انتروباکتریوفاز MS2 فعال

۲-۲-۲- آماده سازی باکتری میزبان (اشرشیا کلی)

به منظور انتخاب باکتری میزبان برای انتروباکتریوفاز MS2 از باکتری اشرشیاکلی F_{amp} (ATCC#700891) استفاده شد. مراحل آماده سازی کشت خالص این باکتری بعنوان میزبان عبارت بودند از :

جدول ۱ ترکیب و نسبت اجزاء تشکیل دهنده محلول های مدل شیر خام

اجزا	نسبت (درصد وزنی حجمی)	شرکت (نوع محصول)
لاکتوز آلفا	۴/۸	شرکت سا پلکو، (U 47287)
پروتئین های آب پنیر گاوی	۰/۷	سیگما، (W1500)
کازئینات سدیم گاوی	۲/۷۵	سیگما، (C8654)
چربی کره	۳/۵	فولکا، (BCR519)

جدول ۲ میزان RNA تام استخراج شده در هر محلول مدل دانه گذاری شده (تلقیح شده) $pg/\mu l$

لاکتوز ^۱	لاکتوز + پروتئین های آب پنیر ^۲	لاکتوز + پروتئین های آب پنیر + کازئین ^۳	لاکتوز + پروتئین های آب پنیر + کازئین + چربی ^۴	غلظت کلی فاز MS2 ^۱
1.3×10^4	3.7×10^4	3.0×10^4	6.7×10^4	1.3×10^4
1.3×10^2	1.8×10^2	2.5×10^2	5.5×10^2	1.3×10^2
۱۳	۷/۴±۰/۳۶	۱۷۹±۱/۳۲	۱۰/۵±۰/۳	۱۳
1.3×10^{-2}	7.1 ± 0.27	1.7 ± 0.99	1.0 ± 0.15	1.3×10^{-2}
1.3×10^{-4}	4.3 ± 0.15	8.6 ± 0.13	9.9 ± 0.28	1.3×10^{-4}

۱- غلظت کلی فاز MS2 بر مبنای تعداد پلاک در هر میلی لیتر

۲- میانگین \pm انحراف معیار (n=12)

1. USEPA
2. Vial
3. Tryptic soy broth
4. Beef extract

1. Accumulation
2. IKA homogenizer(Ultraturrax, T25, Germany)

$1/3 \times 10^{-2}$ ، $1/3$ ، $1/3 \times 10^{-2}$ و $1/3 \times 10^{-4}$ پلاک در هر میلی لیتر تهیه شد.

۲-۴- آماده سازی محلول های مدل شیر خام

تلقیح شده (دانه گذاری شده) برای استخراج

RNA

پس از تلقیح یا دانه گذاری محلول های مدل شیر خام، این محلول ها به مدت یک شبانه روز در دمای 4°C نگهداری شد. سپس در روز بعد RNA ویروسی هر محلول مدل در ۱۲ تکرار توسط روش فنل - تیوسیانات گوانیدین - کلروفورم^۵ استخراج شد [۱۴].

۲-۵- استخراج RNA ژنومی انتروباکتریوفاز

MS2 از محلول های مدل شیر خام

استخراج RNA ویروس براساس روش فنل - تیوسیانات گوانیدین - کلروفورم توسط کیت تجاری تری پیور^۶ انجام شد.

روش استخراج به طور خلاصه عبارت بود از:

الف) اختلاط ۱۰۰ میکرولیتر از هر محلول مدل با یک میلی لیتر محلول تریپیور.

ب) افزودن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم به مخلوط جهت استخراج RNA.

پ) جداسازی فاز آبی (فاز بالا) حاوی RNA وانتقال آن به میکروتیوب^۷ جدید.

ت) رسوب RNA توسط ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپیل الکل. ث) شستشوی رسوب RNA توسط یک میلی لیتر اتانول ۷۵٪.

ج) انحلال و تعلیق مجدد رسوب RNA در ۵۰ میکرولیتر آب DEPC^۸.

۲-۶- اندازه گیری RNA تام انتروباکتریوفاز

MS2 در محلول های مدل شیر خام

RNA تام انتروباکتریوفاز MS2 در هر محلول مدل استخراج شده براساس نانو گرم در میکرولیتر توسط دستگاه

الف) انتقال کشت خالص باکتری به محیط کشت TSA^۱ حاوی آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین و استرپتومایسین از طریق کشت خطی^۲.

ب) گرمخانه گذاری محیط کشت تلقیح شده در دمای 37°C برای مدت یک شبانه روز.

پ) برداشت حداقل یک کلنی از محیط کشت و انتقال آن به محیط کشت TSB حاوی آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین و استرپتومایسین.

ت) گرمخانه گذاری محیط کشت مایع تلقیح شده تا رسیدن به رشد ماکزیمم (جذب نوری بین ۰/۵ - ۰/۱ واحد).

۲-۳- آماده سازی محلول های مدل شیر خام

تلقیح شده (دانه گذاری شده)^۳

۱-۳-۲ تیتراسیون انتروباکتریوفاز MS2

پس از آماده سازی کشت خالص حاوی انتروباکتریوفاز MS2 به منظور تعیین تعداد دقیق انتروباکتریوفاز برحسب پلاک در هر میلی لیتر حداقل از چهار رقت متوالی استفاده شد. جهت رقیق کردن کشت خالص از محیط کشت TSB فاقد آنتی بیوتیک و برای شمارش پلاکها از روش DAL^۴ استفاده شد.

۲-۳-۲- آماده سازی محلول های مدل شیر خام تلقیح

شده

پس از تیتراسیون کشت خالص انتروباکتریوفاز MS2 یک محلول حاوی $1/3 \times 10^5$ پلاک در میلی لیتر از انتروباکتریوفاز MS2 درون محلول بافر فسفات (pH=۷/۲) آماده شد.

سپس با افزودن محلول حاوی انتروباکتریوفاز به محلول های مدل شیر خام پنج رقت (لگاریتمی) با غلظتهای $1/3 \times 10^4$ ،

1. Phenol- guanidine thiocyanat-chloroform

2. Tripure , Roch applied science

3. Microtube

4. Diethylpyrocarbonate

1. Tryptic soy agar

2. Streaking method

3. Seeded or Spiked model solution

4. Double agar layer procedure

کیفیت یا میزان RNA ویروسی استخراج شده = Z
 میزان ماده خشک = X
 غلظت تلقیح ویروس = Y
 نتایج حاکی از آن بود که براساس نحوه پراکندگی داده ها و شاخصهای اولیه مدل (R^2, R^2, R) مدل سطح پاسخ از اعتبار بالایی برای بیان این همبستگی ریاضی برخوردار است. جدول ۲ میزان RNA تام استخراج شده در هر محلول مدل دانه گذاری شده (تلقیح شده)

جدول ۳ میزان RNA ذاتی استخراج شده در هر محلول مدل بدون دانه گذاری $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

پروتئین های آب پیپر + کازئین + چربی لاکوز +	پروتئین های آب پیپر + کازئین لاکوز +	پروتئین های آب پیپر لاکوز +	لاکوز	غلظت کلی فاز MS2
$17/4 \pm 0/86$	$12 \pm 0/35$	$1 \pm 0/6$	$1/3$	$0/00$
	۹	۱۹/۵	$6/5 \pm 0$	

جدول ۴ میزان RNA تام استخراج شده در هر محلول مدل (بدون دانه گذاری - دانه گذاری شده) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

پروتئین های آب پیپر + کازئین + چربی لاکوز +	پروتئین های آب پیپر + کازئین لاکوز +	پروتئین های آب پیپر لاکوز +	لاکوز	غلظت کلی فاز MS2
$50/65$	$4/25$	$11/47$	$16/95$	$1/3 \times 10^{-4}$
$37/76$	$1/8$	$5/92$	$12/05$	$1/3 \times 10^{-2}$
$30/5$	$1/35$	$-0/6$	$0/9$	$1/3$
26	$0/975$	$-2/5$	$-0/4$	$1/3 \times 10^{-2}$
$16/85$	$0/75$	$-11/5$	$-1/9$	$1/3 \times 10^{-4}$

اسپکتروفتومتر نانو دراپ (ND1000, Thermo Scientific, Delaware, USA) اندازه گیری مقدار RNA تام انتروباکتریوفاج MS2 RNA، ذاتی (اولیه) محلول های مدل بدون تلقیح (دانه گذاری شده) اندازه گیری شد به طوریکه مقدار واقعی RNA تام انتروباکتریوفاج MS2 برحسب نانوگرم در میکرولیتر در هر محلول مدل از رابطه زیر تعیین گردید:

مقدار حقیقی RNA تام = (مقدار RNA در نمونه های بدون تلقیح) - (مقدار RNA در نمونه های تلقیح شده)
 همچنین کیفیت RNA تام در هر محلول مدل تلقیح شده که معیاری جهت واکنش های ملکولی^۱ بهینه می باشد براساس تقسیم میزان جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر بر میزان جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری شد.

۲-۷ طرح آماری

در این پژوهش برای آنالیز داده ها از یک طرح تجمعی در مرحله آماده سازی محلول های مدل برای بیان ریاضی استفاده شد. همچنین به منظور دستیابی به بهترین توابع از نرم افزار Sigma Stat (Version 1.0) و برای دستیابی به رویه ها^۲ و نقشه های پیش بینی^۳ از نرم افزار Slide Write (Version 2.0) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نحوه به کار گیری مدل سطح پاسخ به منظور ارزیابی همبستگی

پس از انجام آزمایشات و جمع آوری داده ها (جدول ۲، ۳، ۴ و ۵) به منظور جستجوی هرگونه ارتباط ریاضی اولیه بین کیفیت و میزان RNA ویروسی استخراج شده با میزان ماده خشک و غلظت تلقیح در هر محلول مدل، نحوه پراکندگی داده ها توسط نرم افزار Sigma Stat مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از برآورد اولیه از نحوه آرایش داده ها مدل های سطح پاسخ براساس معادله کلی زیر توسط نرم افزار Slide Write به کار گرفته شد.

$$Z = a_0 + a_1x + a_2y + a_3xy + a_4x^2 + a_5y^2 + a_6x^2y^2 + \dots$$

2. RT-PCR

1. Surface plot

2. Counter isoline

جدول ۵ کیفیت RNA استخراج شده در هر محلول مدل دانه گذاری شده (تلقیح شده) براساس (Absorbance@ 260/280nm)

لاکوز	پروتئین های لاکتوز +	پروتئین های لاکتوز +	پروتئین های لاکتوز +	پروتئین های لاکتوز +	کلی فاز غلظت MS2
۱/۸۹±۰/۰۱	۱/۷۷±۰/۰۳	۱/۶۱±۰/۰۹	۱/۸۶±۰/۰۴	۱/۳×۱۰ ^۴	
۱/۷±۰/۰۵	۱/۷±۰/۰۵	۱/۴۴±۰/۰۲	۱/۷۴±۰/۰۳	۱/۳×۱۰ ^۲	
۱/۶۵±۰/۰۸	۱/۶۴±۰/۰۱	۱/۳۲±۰/۰۴	۱/۶۸±۰/۰۷	۱/۳	
۱/۵۲±۰/۰۵	۱/۵۹±۰/۰۳	۱/۲۹±۰/۰۶	۱/۶۴±۰/۰۳	۱/۳×۱۰ ^{-۲}	
۰/۸۳±۰/۰۷	۱/۴۵±۰/۰۲	۱/۱۲±۰/۰۳	۱/۶±۰/۰۳	۱/۳×۱۰ ^{-۴}	

۳-۲- دستیابی به مدل سطح پاسخ نهایی

پس از دستیابی به مدل سطح پاسخ اولیه، به منظور حذف بعضی از جملات حاوی تغییر مستقل (ماده خشک ، غلظت تلقیح) که اثر کمی روی متغیر وابسته مدل (کیفیت و میزان RNA ویروسی) و در نهایت اعتبار مدل نهایی دارند از روش Step wise موجود در نرم افزا Sigma Stat که شامل دو الگوی رگرسیون رو به عقب Backward Regression و رگرسیون رو به جلو Forward Regression می باشد، استفاده شد [۱۵].

با به کار گیری روش فوق معادلات زیر براساس مدل سطح پاسخ به ترتیب برای میزان RNA ویروسی استخراج شده و کیفیت RNA استخراج شده بدست آمد (اشکال ۱، ۲، ۳ و ۴).

$$Z = a_0 + a_1x + a_2y + a_3x^2 + a_4y^2$$

میزان RNA ویروسی استخراج شده (نانوگرم در میکرولیتر)

$$Z =$$

میزان ماده خشک (گرم درصد)

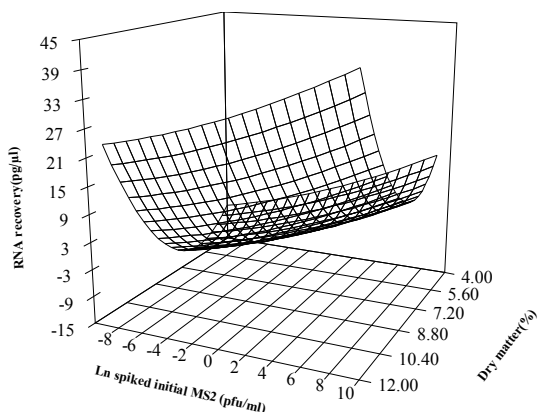
غلظت تلقیح ویروس براساس لگاریتم طبیعی^۱ (پلاک در

میلی لیتر)^۲

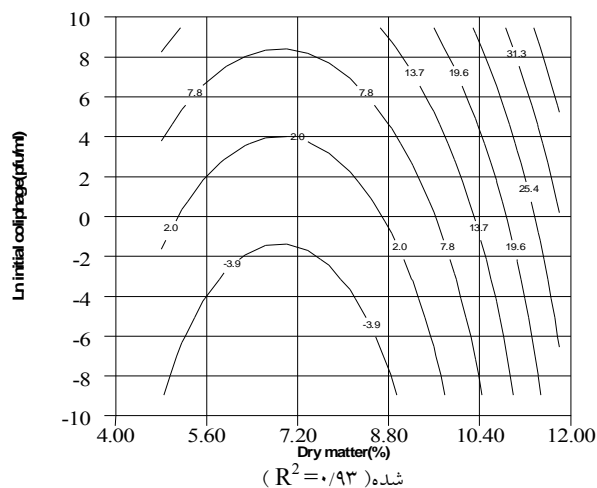
$$a_0 = 63/86 \quad a_1 = -19/27$$

$$a_2 = 1/02 \quad a_3 = 1/39$$

$$a_4 = 0/02$$



شکل ۱ رویه حاصل از مدل سطح پاسخ برای میزان RNA استخراج



شکل ۲ نقشه پیش بینی حاصل از مدل سطح پاسخ برای میزان RNA استخراج شده

1-Ln 2-pfu/ml

3-Absorbance@260/280nm

شاخص هایی که در انتخاب این دومدل سطح پاسخ مدل نظر بوده اند عبارتند از: ضریب همبستگی^۱، ضریب تبیین^۲ ضریب تبیین تصحیح شده^۳ و عدم وجود همبستگی بین متغیرهای مستقل^۴ در مدل نهایی. در جداول ۶ و ۷ نتایج آنالیز تابعیت مدل های سطح پاسخ و جداول ۸ و ۹ نتایج آنالیز واریانس رگرسیون این مدلها ارائه شده است.

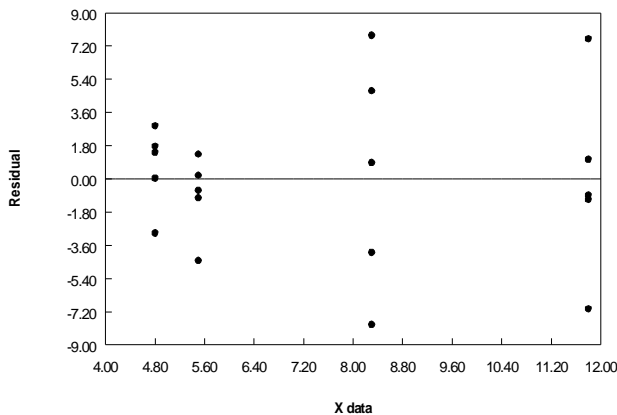
۳-۳- ارزیابی عدم همبستگی (استقلال)

متغیرهای مستقل در مدل نهایی

به منظور بررسی عدم همبستگی (استقلال) متغیرهای مستقل، اختلاف بین مقادیر واقعی Z و مقادیر پیش بینی شده Z (بر اساس مدل) در مقادیر y, x یکسان به عنوان خطا یا باقیمانده در نظر گرفته شد.

(مقادیر پیش بینی شده Z) - (مقادیر واقعی Z) = مقادیر باقیمانده یا خطا^۷

بر این اساس همبستگی بین مقادیر متغیرهای مستقل Y, X و مقادیر خطا در هر مدل ارزیابی شد. نتایج حاکی از آن بود در هر دومدل بر اساس اشکال ۵، ۶، ۷ و ۸ هیچگونه همبستگی بین متغیرهای مستقل (Y, X) با مقادیر خطا مشاهده نشد (R=0).



شکل ۵ رگرسیون حاصل از همبستگی بین مقادیر X با مقادیر خطا در مدل سطح پاسخ میزان RNA استخراج شده (R²=0)

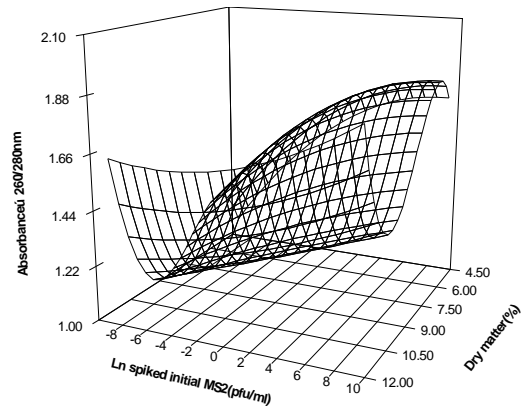
$$Z = a_0 + a_1x + a_2y + a_3xy + a_4x^2 + a_5y^2 + a_6x^2y^2 + a_7x^3$$

کیفیت RNA استخراج شده (جذب نوری در نسبت ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر) Z =

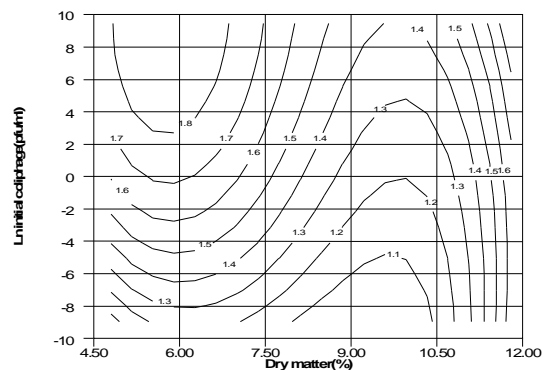
X = میزان ماده خشک (گرم درصد)

غلظت تلقیح ویروس بر اساس لگاریتم طبیعی (پلاک در هر میلی لیتر) Y =

$$\begin{aligned} a_0 &= -۳/۷۳ & a_1 &= ۲/۳۳ \\ a_2 &= ۰/۰۵ & a_3 &= -۰/۰۰۳ \\ a_4 &= -۰/۳۲ & a_5 &= -۰/۰۰۲ \\ a_6 &= ۰/۰۰۰۰۲ & a_7 &= ۰/۰۱۳ \end{aligned}$$



شکل ۳ رویه حاصل از مدل سطح پاسخ برای کیفیت RNA استخراج شده (R²=۰/۸۵)

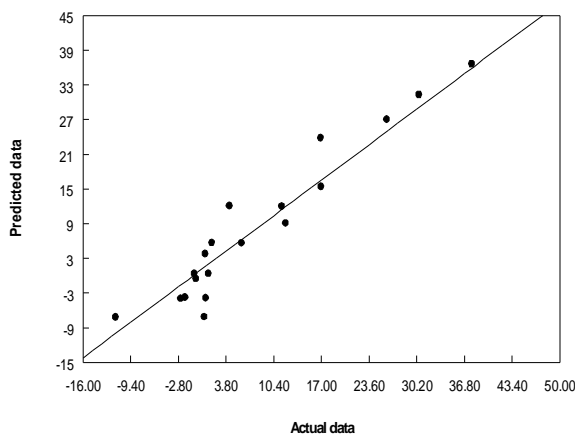


شکل ۴ نقشه پیش بینی حاصل از مدل سطح پاسخ برای کیفیت RNA استخراج شده

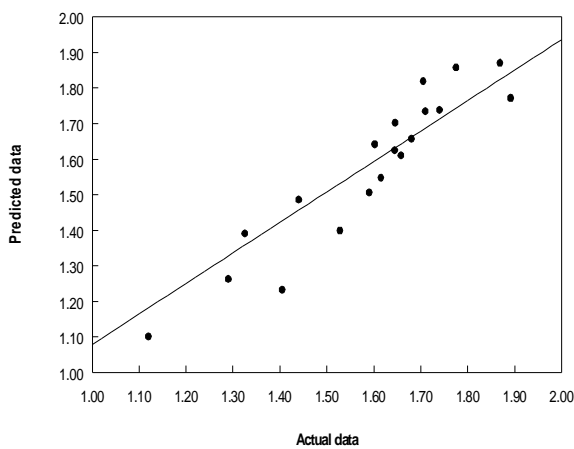
1. Coefficient of Correlation
2. Coefficient of Determination
3. Adjusted R Square
4. Multicollinearity
5. Predicted data
6. Actual data
7. Residual
8. Error

۳-۴- ارزیابی کارایی مدل های سطح پاسخ

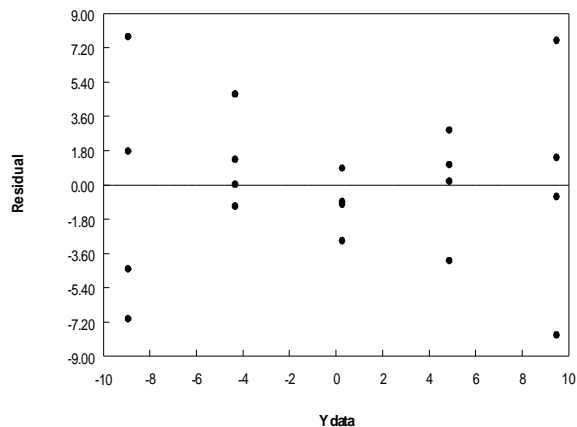
به منظور ارزیابی کارایی مدل های سطح پاسخ، همبستگی بین مقادیر واقعی Z و مقادیر پیش بینی شده Z (متغیر وابسته) توسط معادلات خطی بررسی شد. براساس اشکال ۹ و ۱۰ شاخص های برازش مدل های خطی (R^2 , R , $AdjR^2$) نشان می دهند که همبستگی بالایی بین مقادیر واقعی و مقادیر پیش بینی شده Z وجود داشته و مدل های سطح پاسخ حاصله کارایی بالایی در پیش بینی مقادیر Z (کیفیت و میزان RNA استخراج شده) دارند.



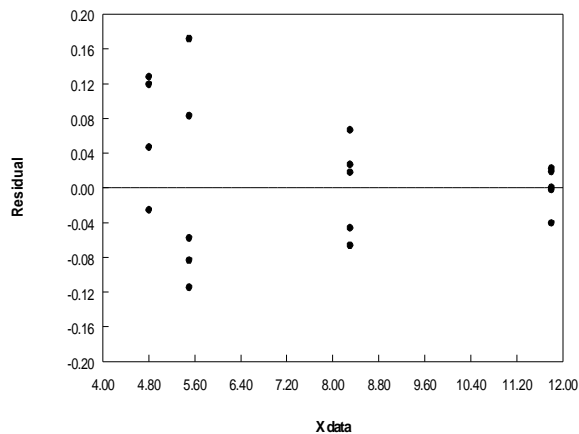
شکل ۹ رگرسیون حاصل از همبستگی بین مقادیر واقعی Z با مقادیر پیش بینی شده از روی مدل سطح پاسخ میزان RNA استخراج شده ($R^2=0.93$) شده



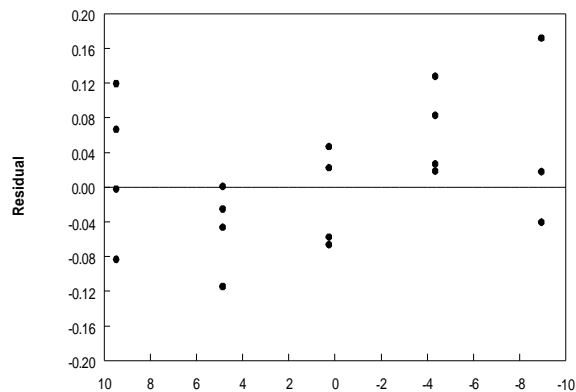
شکل ۱۰ رگرسیون حاصل از همبستگی بین مقادیر واقعی Z با مقادیر پیش بینی شده از روی مدل سطح پاسخ کیفیت RNA استخراج شده ($R^2=0.85$) شده



شکل ۶ رگرسیون حاصل از همبستگی بین مقادیر Y با مقادیر خطا در مدل سطح پاسخ میزان RNA استخراج شده ($R^2=0$)



شکل ۷ رگرسیون حاصل از همبستگی بین مقادیر X با مقادیر خطا در مدل سطح پاسخ کیفیت RNA استخراج شده ($R^2=0$)



شکل ۸ رگرسیون حاصل از همبستگی بین مقادیر Y با مقادیر خطا در مدل سطح پاسخ کیفیت RNA استخراج شده ($R^2=0$)

۳-۵- بررسی اثر مقادیر ماده خشک مدل شیر

خام روی کیفیت و میزان RNA استخراج شده

بر اساس رویه های حاصل از مدل سطح پاسخ به همراه نقشه های پیش بینی حاصل از آنها، در بین ترکیبات موجود در محلول های مدل شیر خام، چربی شیر خام، عاملی تسهیل کننده در کیفیت و میزان استخراج RNA و ویروسی می باشد. در بین محلول های مدل شیر خام، آخرین محلول مدل شیر خام (حاوی چربی) بیشترین میزان استحصال RNA را در شرایط یکسان داراست به طوری که با ورود چربی به سیستم محلول های مدل و از ماده خشک بیش از ۸/۳ گرم درصد، یک سیر صعودی در رویه های حاصل از مدل های سطح پاسخ قابل مشاهده می باشد. همچنین با افزایش ماده خشک شیر از حدود ۴/۸ گرم درصد تا ۸/۳ گرم درصد می توان شاهد سیر نزولی در رویه ها بود. این سیر نزولی رویه ها و به دنبال آن کاهش کیفیت و میزان RNA استخراج شده به ترتیب مقارن با ورود پروتئین های آب پنیر و کازئین در محلول های مدل شیر خام می باشد. اثر تسهیل کننده چربی در کیفیت و میزان استخراج RNA و ویروسی در محلول های مدل شیر خام رامی توان به عوامل مختلفی نسبت داد. اما گمان می رود نیروهای هیدروفوبیک^۱ (آبگریز) مهمترین نقش را بعهده دارند. یکی از این بر هم کنشها، بر همکنش هیدروفوبیک^۱ (آبگریز) کلی فاژ MS2 به همراه بر همکنش هیدروفوبیک^۲ - هیدروفوبیک (آبدوست-آبگریز) RNA تک رشته ای حس مثبت^۳ ویروس با گلبولهای چربی موجود در محلول مدل شیر خام می باشد [۱۶، ۱۷، ۱۸]. از طرف دیگر غشاء گلبولهای چربی، حاوی مواد فعال سطحی با خواص امولسیون کننده بالا می باشند. این غشاء حاوی یک پتانسیل زتا (ζ) منفی می باشد که می تواند در ایجاد بر همکنش های هیدروفوبیک (آبگریز) با RNA ویروس موثر باشد [۱۹-۲۲]. اما برخلاف چربی، پروتئین های موجود در محلول های مدل شیر خام (پروتئین های آب پنیر و کازئین) می توانند از دو طریق نقش بازدارنده روی کیفیت و میزان RNA استخراج شده ویروسی داشته باشند. نخست، پروتئین های موجود در محلول های مدل شیر خام در PH طبیعی غالباً دارای بار منفی می باشند. بر هم کنش این بار منفی با بار منفی طبیعی موجود روی سطح ویروس های روده ای و RNA حاصل از آنها باعث

ایجاد نیروی دافعه و راندن RNA ویروس به سمت فاز هیدروفوبیک (آبگریز) بالا (چربی) میگردد [۱۲]. دیگر آنکه، در روش پایه استخراج فنل - تیوسیانات گوانیدین - کلروفورم (به علت حضور حلالهای آلی) قسمت اعظم پروتئین های موجود در محلول های مدل شیر خام از لحاظ بیولوژیکی به صورت غیر فعال در آمده و به سرعت از فرایند استخراج خارج می گردند درحالی که یکی از موثرترین راههای استخراج بافت چربی استفاده از حلالهای آلی می باشد [۲۳ و ۲۴].

۴- نتیجه گیری

بر مبنای نتایج حاصل از این مطالعه می توان گفت که بر اساس مدل های سطح پاسخ، همبستگی بالایی بین میزان ماده خشک محلول های مدل شیر خام با کیفیت و میزان RNA ویروسی استخراج شده برقرار است. همچنین مشخص شد در بین اجزاء محلول های مدل شیر خام مهمترین عامل تسهیل کننده استخراج RNA ویروسی، چربی می باشد. در حالی که پروتئین های آب پنیر به همراه کازئین بیشترین بازدارندگی را در استخراج RNA ویروسی دارند. بدین ترتیب می توان نتیجه گرفت، هرگونه دستیابی به یک روش جامع به منظور استخراج RNA ویروسهای روده ای و به دنبال آن شناسایی ملکولی آنها، متضمن حذف پروتئین های آب پنیر و کازئین شیر خام و همچنین حفظ چربی شیر خام باید باشد.

جدول ۶ نتایج آنالیز تابعیت مدل سطح پاسخ میزان RNA

P	استخراج شده			متغیرهای مستقل ^۱
	انحراف	ضریب ^۲	معیار(خطای استاندارد) ^۳	
۰/۰۰۰۲	۴/۹۲	۱۲/۹۵	۶۳/۸۶	a ₀
<۰/۰۰۰۱	-۵/۶	۳/۴۳	-۱۹/۲۷	a ₁
<۰/۰۰۰۱	۶/۴۷	۰/۱۵	۱/۰۲	a ₂
<۰/۰۰۰۱	۶/۸	۰/۲	۱/۳۹	a ₃
۰/۴۱۱۵	۰/۸۴	۰/۰۲	۰/۰۲	a ₄

1. Independent Variables
2. Coefficient
3. Standard Error

1. Hydrophobic
2. Hydrophilic
3. SS RNA positive sense

۵- منابع

- [1] Koopmans, M. and Duizer, E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* 90:23-41.
- [2] Koopmans, M., Von Bonsdorff, G.H., Vinje, J., Medici, D. and Monroe, S. 2002. Food borne viruses. *FEMS Microbiology Reviews.* 26:187-205.
- [3] Blackwell, J.H., Cliver, D.O., Callis, J.J., Heidelbaugh, N.D., Larkin, E.P., Mckercher, P.D. and Thayer, D.W. 1984. Food borne Viruses: their importance and need for research. *J. Food Prot.* 48(8):717-723.
- [4] Abbaszadegan, M., Stewart, M., Stewart, P. and Lechevallier, M. 1998. A strategy for detection of viruses in ground water by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(2):444-449.
- [5] Cliver, D.O., Ellender, R.D. and Sobsey, M.D. 1982. Methods for detecting viruses in foods: Background and general principles. *J. Food Prot.* 46(3):248-259.
- [6] Blackwell, J.H., Mckercher, P.D., Kosikowski, F.V., Carmichael, L.E. and Gorewit, R.C. 1982. Physicochemical transformation of milk components and release of food- and-mouth disease viruses. *J. Dairy Sci.* 50:17-250.
- [7] Grabow, W. 2001. Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. *Water SA.* 27:251-268.
- [8] Strauss, J.H. and Sinsheimer, R.L. 1963. Purification and properties of bacteriophage MS2 and its ribonucleic acid. *J. Mol. Biol.* 7:43-54.
- [9] Havelaar, A.H. and Pot-Hogbeem, W.M. 1988. F-specific RNA - bacteriophages as model viruses in water hygiene: Ecological aspects. *Water Sci. Technol.* 20:399-407.
- [10] Grabow, W. 1990. Microbiology of drinking water treatment: reclaimed wastewater. In: McFeters, G.A. (ed). *Drinking water Microbiology Progress and Recent Developments.* Springer Verlag, New York. 185-203.
- [11] Havelaar, A.H., Van Olphen, M. and Drost, Y.C. 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organism for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2956-2962.
- [12] Swaisgood, H.E. 1996. characteristics of milk. *Food chemistry* (3rd ed). p.841-878. In

جدول ۷ نتایج آنالیز تابعیت مدل سطح پاسخ کیفیت RNA

استخراج شده				
P	t	معیار خطای (قر)	استاندارد	مقیاس های مستطیل
۰/۱۹۹	-۱/۳۶	۲/۷۵	-۳/۷۳	a ₀
۰/۰۵	۲/۰۹	۱/۱۱	۲/۳۳	a ₁
۰/۰۰۰۸	۴/۴۴	۰/۰۱۲	۰/۰۵	a ₂
۰/۰۳	-۲/۳۹	۰/۰۰۱	-۰/۰۰۳	a ₃
۰/۰۴	-۲/۲۵	۰/۱۴	-۰/۳۲	a ₄
۰/۰۶	-۲/۰۱	۰/۰۰۱	-۰/۰۰۲	a ₅
۰/۱۲	۱/۶۵	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۲	a ₆
۰/۰۳	۲/۳۹	۰/۰۰۵	۰/۰۱۳	a ₇

جدول ۸ نتایج آنالیز واریانس رگرسیون مدل سطح پاسخ

میزان RNA استخراج شده				
F	MS	SS	DF	
۵۰/۸	۱۰۷۶	۴۳۰۴/۲	۴	رگرسیون ^۱
—	۲۱/۲	۳۱۷/۵	۱۵	باقیمانده ^۲
—	۲۴۳/۲	۴۶۲۱/۷	۱۹	کل ^۳

1. Regression
2. Residual
3. Total

جدول ۹ نتایج آنالیز واریانس رگرسیون مدل سطح پاسخ کیفیت

میزان RNA استخراج شده					
P	F	MS	SS	D F	
۰/۰۰۰۳	۱۰/۲	۱۵۳۶	۱۰۷۵	۷	رگرسیون
—	—	۰	۱	۱	باقیمانده
—	—	۰/۰۱۵	۱۸۱	۱۲	باقیمانده
—	—	۱۰۶۶۱	۲۵۶	۱۹	کل

- retention by MF membranes . J. Membr. Sci . 194:69-79.
- [19] Corroding , M.and Dalgleish ,D.G. 1997. Isolate from industrial butter milk: emulsifying properties of materials derived from fat globule membrane . J.Agric Food Chem.. 45:4595-600.
- [20] Dewettinck ,K.,Rombaut ,R., Thienport, N.,Le , T.,Messens ,K.and Camp , I.V.2007. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material (Review). Int .Dairy .J.18:436-457.
- [21] Kanno ,C., Shimomura ,Y.and Takano ,E. 1991 .Physicochemical properties of milk fat emulsions stabilized with bovine milk fat globule membrane .J.Food Sci.56:1219-1223.
- [22] Michalski ,M.C., Michel ,F., Sainmont ,D. and Briard ,V. 2001 . Apparent ζ potential as a tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane . Colloids and surface B:Biointerfaces. 23:23-30.
- [23] Miller, G.J., Applegate, S.L.,Radloff ,H.D.and Nelms ,G.E.1980. Rapid extraction of milk fat. J.Dairy Sci.64:1861-1862.
- P.F.FOX (ed). Marcel Dekkel ,Inc. New York.
- [13] Environmental Protection Agency. 2001. Male -specific (F⁺) and somatic coliphage in water by two step enrichment procedure .Method 1601. Office of Water, Washington, D.C.20460.
- [14] Chomczynski,P.and Sacchi,N.1987.Single -step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanat - phenol - chloroform extraction .Anal .Biochem .162:156-159.
- [15] Yavarmanesh, M., Mortazavi, A.and Habibi Najafi,M.B.2008.Prediction of microbial quality in raw milk by mathematical models.IJFST. 4(4):53-63.
- [16] Eichler,D.2006 .Medical biochemistry.p.11-20.Jones and Bartlitt. Sudbury.
- [17] Hadad ,L.C.2002 .Nucleic acid isolation by adhering to hydrophobic solid phase and removing with nonionic surfactant . United States Patent. 6383783.
- [18] Van Voorthuizen, E.M.,Ashbolt , N.J. and Schafer, A.I.2001. Role of hydrophobic and electrostatic intractions for initial enteric virus

Evaluation of correlation between quality and amount of the extracted viral RNA from raw milk with the amount of raw milk dry Matter for molecular detection of enteric viruses using response surface model

Yavarmanesh, M. ^{1*}, Mortazavi, A. ², Habibi Najafi, M. B. ², Abbaszadegan, M. ³

1. Ph.D. Student and Instructor of Food Science and Technology Department, Ferdowsi University of

Mashhad 2. Professor, Food Science and Technology Department, Ferdowsi University of Mashhad

3. Professor, Civil and Environmental Engineering Department, Arizona State University, USA.

(Received: 87/11/27 Accepted: 88/2/12)

Nowadays, presence of enteric viruses in water and some foods is proved as a cause for infectious diseases. Raw milk can transmit enteric viruses potentially. Lack of distinct protocol for recovery and extraction of these viruses from raw milk made us to evaluate the effect of dry matter amount on quality and amount of viral RNA yield. Therefore according to reverse of routine protocols in separating of milk components, we prepared four milk model solutions in different combinations and ratios based on natural raw milk components. Then, each milk model solution was spiked with five levels of MS2 coliphage (1.3×10^4 , 1.3×10^2 , 1.3, 1.3×10^{-2} , 1.3×10^{-4} pfu/ml). We isolated the viral RNA from each milk model solution using phenol - guanidine thiocyanat - chloroform method. Also we measured quality and RNA extraction Yield in twelve frequencies by nanodrop spectrophotometer. The results showed that in the equal viral concentration, the most amount of viral RNA was extracted from whole milk model solution (including fat). Whereas casein and whey proteins had the most inhibition in the viral RNA extraction. Also the highest quality of the extracted RNA for molecular detection was related to whole milk model solution. Based on response surface model (polynomial) RNA extraction yield and quality of the extracted RNA were closely correlated to the amount of dry matter of milk model together with coliphage concentration ($R=0/96$ and $R= 0/92$ respectively).

Key words: Correlation, RNA extraction yield, Quality of extracted RNA, Milk dry matter, Enteric viruses.

* Corresponding Author E-Mail Address: yavarmanesh@ um.ac.ir