تکثیر و تیپ‌بندی فلاژلین سودوموناس آئروژینوزا به روش مولکولی

غلامرضا گودرزی[1]، عباس یادگار[2]

[1]-استادیار، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

۲-دانشجوی دکتری تخصصی، گروه باکتری شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

یافته / دوره سیزدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۰ / مسلسل ۴۸

چکیده

دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۲۲ ، پذیرش مقاله: ۹۰/۱/۲۱

* **مقدمه:** سودوموناس آئروژینوزا دارای یک فلاژل قطبی است که از زیرواحدهای فلاژلین که توسط ژن **fliC** کد می‌گردد ساخته می‌شود. فلاژلین سویه‌های مختلف سودوموناس آئروژینوزا بر اساس واکنش با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و وزن مولکولی به دو تیپ سرولوژیک **a** یا **b** تقسیم می‌شود.هدف از این مطالعه تکثیر و تیپ‌بندی فلاژلین سودوموناس آئروژینوزا به روش مولکولی بود.

* **مواد و روش‌ها:** پس از استخراج **DNA** ژنومی از دو سویه استاندارد **M** ۸۸۲۱ (فلاژلین تیپ **a**) و **PAO1** (فلاژلین تیپ **b**) و چند سویه بالینی سودوموناس آئروژینوزا، با طراحی یک جفت پرایمر اختصاصی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز **(PCR)**، ژن کامل **fliC** سویه‌های مورد آزمایش تکثیر و از نظر طول قطعه ژنی مقایسه گردید.

* **یافته‌ها:** نتایج **PCR** و تعیین توالی نشان داد که طول ژن**fliC** در سویه‌های تیپ **a** و **b** متفاوت و به ترتیب **bp** ۱۱۶۰ و **bp** ۱۴۶۰ می‌باشد.

* **بحث و نتیجه‌گیری:** این روش می‌تواند در تشخیص سویه‌های فلاژل دار (متحرک) و فاقد فلاژل سودوموناس آئروژینوزا، تکثیر کامل توالی ژن **fliC** به منظورکلون‌سازی و بیان پروتئین فلاژلین نوترکیب کاربرد داشته و همچنین جایگزین روش تیپ بندی سرولوژیک فلاژل باشد.

* **واژه‌های کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، ژن فلاژلین، **fliC**

آدرس مکاتبه: خرم آباد،کیلومتر۳جاده خرم‌آباد-بروجرد، پردیس دانشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان

پست الکترونیک: goudarzi.gh@gmail.com

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یکی از عوامل عفونی فرصت طلب، می‌تواند در طیف وسیعی از بیماران با ضعف ایمنی شامل افراد مبتلا به سرطان، سیستیک فیبروزیس، سوختگی و غیره عفونت‌های کشنده‌ای را ایجاد کند (۳-۱). این باکتری دارای فاکتورهای ویرولانس متنوعی چون انواع پروتئازها، اگزوتوکسین‌ها، پلی‌ساکاریدها، فلاژل و غیره است (۴)،که در این بین اهمیت فلاژل به عنوان عامل مهم حرکت، کموتاکسی، و کلونیزاسیون باکتری در بافت‌ها و همچنین در تحریک مستقیم سیستم ایمنی ذاتی از طریق Toll (TLR-5) like receptor-5 حائز اهمیت است (۸-۵). فلاژل سودوموناس آئروژینوزا از پروتئین ساختاری "فلاژلین" ساخته شده که از نظر واکنش با آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و وزن مولکولی به دو تیپ اصلی a و b تقسیم می‌شود. تیپ b دارای یک سروتیپ و تیپ a دارای چند سروتیپ محدود آنتی‌ژنیک می‌باشد (۹). این پروتئین (فلاژلین) یک ایمونوژن قوی است و بین تیپ‌های مختلف آن واکنش متقاطع دیده می شود، از این رو سال‌هاست که به عنوان کاندید واکسن در عفونت‌های سوختگی و ریوی مورد توجه بوده است (۱۰، ۱۱). با توجه به اهمیت این موضوع، طراحی پرایمر و بهینه‌سازی روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به منظور تعیین فراوانی فلاژل در سویه‌های بالینی، تیپ بندی سویه‌ها با روش مولکولی و تکثیر توالی کامل ژن فلاژلین (**fliC**) با هدف کلون‌سازی و بیان پروتئین نوترکیب آن از اهداف این مطالعه بوده است.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد و سویه‌های باکتریایی:

سویه سودوموناس آئروژینوزا M ۸۸۲۱ (تیپ a) توسط دکتر پرویز اولیاء (دانشگاه شاهد) به بخش باکتری شناسی دانشگاه تربیت مدرس اهدا شد. سویه سودوموناس آئروژینوزا PAO1 (تیپ b) از دانشگاه الزهرا تهران تهیه گردید و سویه‌های بالینی نیز از بیمارستان‌های شهر تهران جمع‌آوری شدند. سویه‌های مورد نظر با استفاده از تست‌های بیوشیمایی چون اکسیداز، OF گلوکز، تولید پیگمان در ۲۵ درجه سانتیگراد و دکربوکسیلاسیون لیزین تعیین هویت گردیدند.

تمامی مواد مورد نیاز در واکنش PCR از شرکت فرمنتاز (Fermentas) خریداری شد.

استخراج DNA:

سویه‌های مورد نظر ابتدا در ۲ سی‌سی محیط لوریا براث (LB broth) کشت داده شدند و پس از یک شب انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد، سانتریفوژ و از رسوب حاصل استخراج DNA صورت گرفت. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) بر اساس دستورالعمل کیت انجام گرفت. سپس از محصولات استخراج، ۵ µl بر روی ژل آگارز (سیگما) ۰/۸ ٪ الکتروفورز شد و در کنار مارکر ۱۰۰۰ bp با اتیدیوم بروماید رنگ و باندها زیر نور ماوراء بنفش رویت گردید.

طراحی پرایمرها:

در طراحی پرایمرها برای شناسایی و تکثیر ژن **fliC** از توالی کلیه ژن‌های فلاژلین سودوموناس آئروژینوزا موجود در بانک ژنی NCBI استفاده شد و بر این اساس یک جفت پرایمر عمومی که بتواند تیپ‌های مختلف (a و b) فلاژلین را پوشش دهد طراحی و توسط شرکت سیناژن ساخته شد.

Forward: 5′ ATGGCCTTGACCGTCAAC 3′

Reverse:5′ GCGCAGCAGGCTCAGAAC 3′

به منظور ارزیابی اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده، توالی‌های فوق در سایت NCBI بلاست (BLAST) شد و میزان همپوشانی و واکنش متقاطع با سایر ارگانیسم‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ایجاد مواردی چون لوپ، دایمر و غیره در پرایمرها توسط نرم افزار GeneRunner ارزیابی شد.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-10-12]

بهینه‌سازی مراحل PCR:

واکنش PCR به طور جداگانه با DNA ژنومی سویه‌های M ۸۸۲۱ و PAO1 و سویه‌های بالینی در حجم‌های ۲۵ µl با شرایط زیر بهینه شد:

- بافر X ۱۰: ۲/۵ µl
- آب دیونیزه: ۱۹/۷۵ µl
- $MgCl_2$: ۰/۷۵ µl (۱/۵mM)
- dNTP: ۰/۵ µl (۰/۲mM)
- از هر پرایمر: ۱ µl (۰/۵ µM)
- DNA ژنومی: ۲ µl (۳۰۰ ng)

و ژن فلاژلین (**fliC**) در شرایط زیر با استفاده از دستگاه گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف) تکثیر و همانندسازی شد.

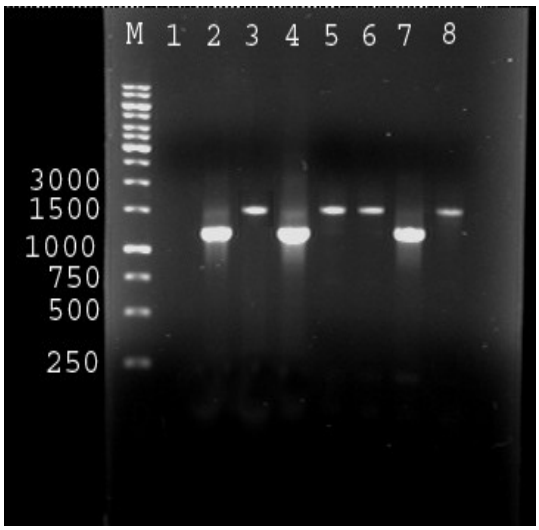
- ۹۴ ^{o}C ۴ دقیقه
- ۹۴^{o} C ۱ دقیقه
- ۵۶/۲^{o} C ۱ دقیقه ۳۰ چرخه
- ۷۲^{o} C ۱ دقیقه
- ۷۲^{o} C ۱۰ دقیقه

از محصولات PCR ۵ µl بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ گردید (۱۲، ۱۳). در نهایت، محصولات PCR تعیین توالی گردید (TAG Copenhage A/S Symbion, Denmark).

یافته‌ها

پس از اینکه سویه‌های مورد آزمایش با تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شد، از آنها استخراج DNA ژنومی به عمل آمد که هر استخراج دارای غلظتی معادل ۳۰۰ ng/µl بود.

ژن‌های **fliC** سویه‌های مورد آزمایش در شرایط بهینه تکثیر شد. با توجه به شکل ۱ ، الکتروفورز محصولات بر روی ژل آگارز و نتایج تعیین توالی (نتایج ارائه نشده) نشان داد که سویه‌های M ۸۸۲۱ و PAO1 به ترتیب دارای ۱۱۶۰ bp و ۱۴۶۰ bp می‌باشند.



شکل ۱- محصول PCR ژن فلاژلین سویه های استاندارد و بالینی سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده. M: DNA size marker (1kb)، مسیر ۱: استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان کنترل منفی ، مسیر ۲: سویه M ۸۸۲۱ به عنوان کنترل مثبت برای تیپ a فلاژلین، مسیر ۳: سویه PAO1 به عنوان کنترل مثبت برای تیپ b فلاژلین، مسیر ۴ و ۷: ایزوله‌های بالینی دارای تیپ a فلاژلین، مسیر ۵ ، ۶ و ۸: ایزوله‌های بالینی دارای تیپ b فلاژلین.

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه نقش فلاژل و فلاژلین در استقرار عفونت‌های حاد سودومونایی و ایجاد التهاب در عفونت‌های ریوی، قرنیه، سوختگی، سیستیک فیبروزیس و غیره به خوبی شناخته شده است (۱، ۱۴). لذا مطالعات وسیعی در جهت شناخت ساختار فلاژل و فلاژلین، میانکنش‌های بافتی و مهار ایمونولوژیک از طریق واکسیناسیون در مدل‌های مختلف حیوانی انجام گرفته است و حتی اخیراً واکسن دو ظرفیتی فلاژل (a و b) در بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس مورد آزمایش قرار گرفته است و نتایج رضایت بخشی را به همراه داشته است (۱۵).

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-10-12]

در این مطالعه ما توانستیم با طراحی یک جفت پرایمر اختصاصی و بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR، ژن ساختاری فلاژلین سودوموناس آئروژینوزا را شناسایی و تکثیر کنیم. این پرایمرها به ابتدا و انتهای ژن متصل شده و با توجه به نتایج تعیین توالی و آزمون بلاست، اولیگونوکلئوتیدهای طراحی شده توالی کامل ژن **fliC** را تکثیر و به طور اختصاصی به ژن فلاژلین سودوموناس آئروژینوزا اتصال می‌یابند. نتایج حاصل از PCR و تعیین توالی ژن **fliC** دو سویه M۸۸۲۱ (تیپ a) و PAO1 (تیپ b) و تعدادی از سویه‌های بالینی مورد آزمایش نشان داد که توالی ژن فلاژلین تیپ b بزرگتر از تیپ a بوده و این نتایج کاملاً با توالی‌های **fliC** موجود در بانک ژنی NCBI مطابقت دارد.

وینستانلی و همکارانش با مقایسه توالی ژن فلاژلین چند سویه سودوموناس آئروژینوزا و سودوموناس پوتیدا یک جفت پرایمر اختصاصی نواحی N و C ترمینال طراحی کردند و توانستند بخشی از ژن فلاژلین را در تعدادی از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا شناسایی و تکثیر کنند (۱۶). به دلیل اینکه این اولیگونوکلئوتیدها توالی کامل ژن **fliC** (فلاژلین) را تکثیر نمی کرد لذا محصولات PCR سویه‌های تیپ a و سویه‌های تیپ b به ترتیب ۱۰۲۰ bp و ۱۲۵۰ bp بود. همچنین برایمر و همکاران با این پرایمرها قسمتی از ژن فلاژلین چندین سویه تیپ a را تکثیر و پس از کلون‌سازی در وکتور T، این توالی‌ها را با سویه PAO1 (تیپ b) مقایسه کردند نتایج آنها نیز نشان داد که سویه‌های تیپ a دارای توالی نوکلئوتیدی کوتاه‌تری نسبت به تیپ b هستند، بنابراین این اختلاف باعث شده که فلاژلین‌های تیپ a از نظر پروتئینی نیز وزن مولکولی کمتری نسبت به تیپ b داشته باشند (۱۷). به طور کلی با این روش می‌توان سویه‌های فلاژل دار سودوموناس آئروژینوزا را از سویه‌های فاقد فلاژل افتراق و فراوانی آنها را در هر منطقه تعیین نمود. همچنین این روش می‌تواند در کنار روش‌های سرولوژیک برای تیپ بندی فلاژلین‌ها مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعه‌ای دیگر، ما توانستیم با استفاده از این پرایمرها و قرار دادن دادن محل‌های برش برای آنزیم‌های محدود الاثر و تکنیک PCR، توالی کامل ژن فلاژلین سویه M ۸۸۲۱ را تکثیر و آن را در وکتورهای بیان کننده کلون و پروتئین فلاژلین نوترکیب سودوموناس آئروژینوزا را در سطح بالایی در E.coli بیان و تولید کنیم و در سطح وسعیتری به عنوان یک کاندید واکسن در عفونت های سودومونایی در مدل موش آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار دهیم (نتایج ارائه نشده). لذا ردیابی ژن **fliC** و تکثیر آن توسط روش مذکور در تکنیک کلونینگ نیز کاربرد دارد.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-10-12]

References

1. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. Drugs, 2007; 67:351-68.
2. Krcmery V, Koprnova J, Korcova J. Pseudomonas aeruginosa bacteraemia in cancer patients. J Infection, 2006; 52: 461-464
3. D?ring G, Pier GB. Vaccines and immunotherapy against Pseudomonas aeruginosa. Vaccine, 2008; 26: 1011-1024
4. Norberto JP. Pseudomonas In: Topley & Wilsons Microbiology and Microbial infections, Washington, Hodder Arnold, 2005; Vol 2: p1591-1603
5. Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. Trends Microbiol, 2004; 12(11): 509-517
6. Steiner Theodore S. How Flagellin and Toll-Like Receptor 5 Contribute to Enteric Infection. Infect immun, 2007; 75(2): 545-552
7. Steiner Theodore S. Identification of Pseudomonas aeruginosa flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. Infect immun, 2007; 75(2): 545-552
8. Adamo R, Sokol S, Prince A. Pseudomonas aeruginosa Flagella Activate Airway Epithelial Cells through asialoGM1 and Toll-Like Receptor 2 as well as Toll-Like Receptor 5. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004; 30: 627-634.
9. Brimer CD, Montie TC. Cloning and Comparison of fliC Genes and Identification of Glycosylation in the Flagellin of Pseudomonas aeruginosa a-Type Strains. J Bacteriol, 1998; 180(12): 3209-3217
10. Holder IA, Pseudomonas immunotherapy: a historical overview.Vaccine, 2004; 22: 831-839
11. Holder IA, Wheeler R, Montie TC. Flagellar Preparations from Pseudomonas aeruginosa: Animal Protection Studies. Infect immun, 1982; 35(1):276-280
12. Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, C.S.H.L Press, 2001; Vol 2: p 8.18-22
13. Wong DWS. Techniques used in cloning. The ABCs of Gene Cloning, New York, Springer, 2006; 77-80
14. Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, Prince A. Role of Flagella in Pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa Pulmonary Infection. Infect immun, 1998; 66(1): 43-51
15. D?ring G, Meisner C, Stern M. A double-blind randomized placebo-controlled phase III study of a Pseudomonas aeruginosa flagella vaccine in cystic fibrosis patients. PNAS, 2007; 26(104): 11020-11025
16. Winstanley C, Coulson MA, Wepner B, Morgan JA, Hart CA. Flagellin gene and protein variation amongst clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Microbiol, 1996; 142: 2145-2151
17. Brimer CD, Montie TC. Cloning and Comparison of fliC Genes and Identification of Glycosylation in the Flagellin of Pseudomonas aeruginosa a-Type Strains. J Bacteriol, 1998; 180(12): 3209-3217.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-10-12]

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

[Downloaded from yafte.lums.ac.ir on 2024-10-12]