تحقیقی

شناسایی ژن *fli C* (فلاژلین) در *سودوموناس ائروژینوزا* های جدا شده از نمونه های بالینی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)

عباسعلی ایمانی فولادی
استادیار مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی ، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...«عج»

مرتضی ستاری
دانشیار گروه باکتری شناسی ،دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

غلامرضا گودرزی
دانشجوی دکترای تخصصی، گروه باکتری شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

نویسنده مسئول: مرتضی ستاری
تلفن: ۸۲۸۸۳۵۶۳-۰۲۱
پست الکترونیک: Sattarim@modares.ac.ir
آدرس: تهران، تقاطع بزرگراه آل احمد – چمران (پل نصر)، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی ۲ ،گروه باکتری شناسی ص.پ : ۱۵۸-۱۴۱۱۵

وصول مقاله: ۸۷/۱۲/۱۸
اصلاح نهایی: ۸۸/۷/۱۱
پذیرش مقاله: ۸۸/۹/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس ائروژینوزا پاتوژنی فرصت طلب است که می تواند در بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی یا دارای عوامل مستعد کننده ، عفونتهای کشنده ای ایجاد کند. این باکتری دارای یک فلاژل قطبی است که باعث حرکت، کموتاکسی و کلونیزاسیون در مرحله حاد عفونت می گردد. فلاژل از پروتئین ساختاری فلاژلین (fliC) ساخته می شود.هدف از این مطالعه بررسی فراوانی ژن fliC در سویه های کلینیکی می باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه با طراحی یک جفت پرایمر اختصاصی برای تیپهای فلاژلین (a و b) وبا استفاده از روش PCR ، ژن ساختاری آن (fliC) در نمونه های کلینیکی شناسایی شد .*

یافته ها: *پرایمر طراحی شده از کارایی بسیار مناسبی برخوردار بود و در تشخیص فلاژل سودوموناس ائروژینوزا قابل استفاده است. در بررسیهای انجام یافته بر روی سویه های بالینی مشخص شده است که ۸۵٪ از سویه های بالینی ژن fliC را دارند.*

نتیجه گیری: *پرایمر طراحی شده در این تحقیق درشناسایی سویه های کلینکی متحرک وتیپ بندی آنتی ژنیک آنها قابل استفاده است.*

واژه‌های کلیدی *سودوموناس ائروژینوزا ، فلاژلین ، fliC، PCR*

مقدمه

سودوموناس ائروژینوزا یکی از عوامل عفونی فرصت طلب است که می تواند در طیف وسیعی از بیماران مبتلا به ضعف ایمنی، شامل افراد مبتلا به سرطان ، سیستیک فیبروزیس ، سوختگی و..... عفونت های کشنده ای ایجاد کند(۱،۲،۳). این باکتری دارای عوامل ویرولانس متنوعی چون انواع پروتئاز ها ، اگزوتوکسینها ، پلی ساکارید ها ، فلاژل و غیره است (۴)که در این بین اهمیت فلاژل به عنوان عامل مهم حرکت ، کموتاکسی ، و استقرار باکتری در بافتها و همچنین نقش فلاژلین در تحریک مستقیم سیستم ایمنی ذاتی از طریق Toll like receptor حائز اهمیت است(۵،۶،۷،۸) .فلاژل *سودوموناس ائروژینوزا* از پروتئین ساختاری "فلاژلین" ساخته شده که دارای دو تیپ اصلی آنتی ژنی a و b است. تیپ b دارای یک سروتیپ وتیپ a دارای چند سروتیپ محدود آنتی ژنیک می باشد(۹).

۶۰ درصد سویه ها دارای تیپ b و بقیه تیپ a هستند. این پروتئین یک ایمونوژن قوی است و بین تیپهای مختلف آن واکنش متقاطع دیده می شود، از اینرو سالهاست که برای کاندید واکسن مورد توجه است(۱۰،۱۱). با توجه به اهمیت این موضوع، طراحی و بهینه سازی روش مولکولی واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) به منظور تعیین فراوانی فلاژل در سویه های بالینی و تیپ بندی سرولوژیک سویه ها از اهداف این مطالعه بوده است.

روش بررسی

- تهیه مواد و سویه های باکتریایی:

سویه *سودوموناس آئروژینوزای* M ۸۸۲۱ (تیپ a) از دکتر اولیاء دانشگاه شاهد و سویه سودوموناس آئروژینوزای PAO1 ، (تیپ B) از دانشگاه الزهرای تهران تهیه گردید. سویه های فوق و سویه های بالینی با استفاده از تستهای بیوشیمایی چون اکسیداز، OF گلوکز، تولید پیگمان در ۲۵ درجه سانتیگراد ، دکربوکسیلاسیون لیزین تعیین هویت شدند. تمامی مواد مورد نیاز در واکنش PCR را از شرکت فرمنتاز(Fermentas) خریداری کردیم.

- استخراج DNA :

سویه های مورد نظر ابتدا در ۲ سی سی محیط لوریا براث کشت داده شدند و پس از یک شب انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد 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 ۵µl از محصولات استخراج شده 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 گردیدند.

- طراحی پرایمر ها:

در طراحی پرایمرها برای شناسایی و تکثیر ژن *fliC* از توالی کلیه ژنهای فلاژلین *سودوموناس ائروژینوزا* ی موجود در بانک ژنی NCBI استفاده شد و بر این اساس یک جفت پرایمر عمومی که بتواند تیپهای مختلف(a وb) فلاژلین را پوشش دهد با نرم افزار Allele ID6 طراحی و توسط شرکت سیناژن ساخته شد

	start	len	tm	GC%	seq
Forward Primer	237	21	53	52.38	**5'- TGAACGTGGCTACCAAGAACG -3'**
Reverse Primer	415	20	50	48.62	**5'- TCTGCAGTTGCTTCACTTCGC -3'**

PRODUCT SIZE: 180 bp

به منظور ارزیابی اختصاصیت پرایمر های طراحی شده، توالی های فوق در سایت NCBI بلاست شد و میزان همپوشانی و واکنش متقاطع با سایر ارگانیسم ها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ایجاد مواردی چون لوپ ،دایمر و..... در پرایمرها توسط نرم افزار Allele ID6 ارزیابی شد.

- **بهینه سازی مراحل PCR :**

واکنش PCR به طور جداگا نه با DNA ژنومی سویه های M 8821 و PAO1 در حجم های ۲۵ µl با شرایط زیر بهینه شد:

- با فر X ۱۰ : ۲/۵ µl
- آب دیونیزه : ۱۹/۵ µl
- $MgCl_2$: ۱ µl (۲/۵mM)
- 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 همانند سازی شد.

- ۹٤ ^{o} ٤ دقیقه
- ۳۵ چرخه:
  - ۹٤^{o} ۱ دقیقه
  - ٥٦/۲^{o} ۱ دقیقه
  - ۷۲^{o} ۱ دقیقه
- ۷۲^{o} ۱۰ دقیقه

در نهایت از محصولات PCR ۵ µl بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ گردید(۱۳،۱۲).

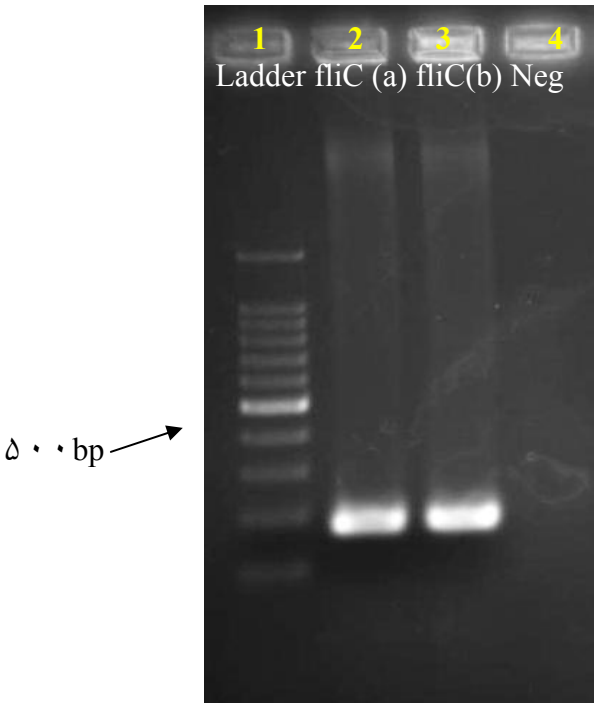
- **وجود ژن fliC در سویه های کلینیکی *سودوموناس ائروژینوزا*:**

به منظور ارزیابی پرایمر طراحی شده از ۳۵ سویه *سودوموناس ائروژینوزای* جدا شده از نمونه های بالینی به همراه سویه های استاندارد از نظر وجود ژن fliC استفاد شد.

یافته ها

پس از اینکه هویت سویه های مورد آزمایش با تستهای بیوشیمیایی تعیین شد، DNA ژنومی از آنها استخراج شد. غلظت DNA ژنومی با دستگاه Nano Drap و الکتروفورز ۲میکرولیتر DNA استخراج شده بر روی آگارز ۰/۸ ٪ مورد تایید قرار گرفت ، که هر استخراج تقریبا دارای غلظتی بین ۵۰۰-۳۰۰ ng/µl بود.

ژنهای *fliC* سویه های مورد آزمایش در شرایط بهینه PCR و تکثیر شد و الکتروفورز محصولات واکنش نشان داد که سویه های M 8821 و PAO1 دارای ۱۸۰ bp می باشند (شکل۱). در مطالعه انجام یافته بر روی سویه های کلینیکی مشخص گردید که ۸۵٪ آنها دارای ژن fliC می باشند



شکل ۱: تصویر PCR مربوط به ژن flic می باشد. ۱) DNA ladder ۲) fliC مربوط به سویه تیپ فلاژل a ۳)fliC مربوط به سویه تیپ فلاژل b ٤) کنترل منفی

بحث

سودوموناس ائروژینوزا یکی از عوامل اصلی عفونتهای بیمارستانی است و در بیماران با نقص ایمنی و مبتلایان به سیستیک فیبروزیس یک عامل بیماریزای اصلی

محسوب می شود(۱۴)و در مبتلایان به بیماری ریوی مزمن یکی از عوامل اصلی مرگ و میر است(۱۵) .

نقش فلاژل و فلاژلین در استقرار عفونتهای حاد سودوموناید وایجاد التهاب در عفونتهای ریوی ، قرنیه ، سوختگی، سیستیک فیبروزیس و غیره به خوبی شناخته شده است(۱۷،۱۶).لذا مطالعات وسیعی برای 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(۱۸). امروزه مولکولار تایپینگ ژن فلاژل در شناسایی این باکتری کمک زیادی می کند . در *سودوموناس ائروژینوزا* دو نوع فلاژل وجود دارد که به تیپ a وb معروفند. از آنجایی که این دو نوع فلاژل در شدت بیماریزایی و کلونیزاسیون باکتری در محل عفونت بسیار مهمند، این مطالعه سعی شد پرایمری واحد طراحی شود که کاملا با توالیهای *fliC* موجود در بانک ژنی NCBI مطابقت دارد، و قادر است هر دونوع فلاژل را تشخیص دهد . ازطرفی دیگر با این جفت پرایمر می توان بررسی کرد که چند درصد از سویه های پاتوژن جدا شده از بیماران دارای فلاژل می باشند . در تحقیق حاضر مشخص شد که حدود ۸۵٪ از سویه های بالینی حاوی یکی از دو ژن می باشند که موید این نکته است که فلاژل نقش مهمی در کلونیزاسیون و بیماریزایی ایفا می کند.در مطالعات دیگران نیز مشخص شده است که فلاژل قادر به ایجاد عفونت است و سویه های حاوی آن موجب مرگ ومیر بالا می شوند (۱۹)، از این روی باید در سویه های بالینی به میزان بالایی وجود داشته باشد و این نکته در مطالعه حاضر ثابت شده است. مطالعه و ساخت واکسن علیه این آنتی ژن می تواند میزان مرگ و میر ناشی از این باکتری را به طور چشمگیری کاهش دهد (۲۰).

با توجه به اینکه سرعت در تشخیص سویه *سودوموناس ائروژینوزا* مهاجم می تواند در روند درمان و نجات جان افراد موثر باشد و ازسوی دیگر فلاژل یکی از عوامل اصلی در بیماریزایی و کلونیزاسیون باکتری است، تشخیص سریع این عامل به روش مولکولی ممکن است شیوه ای تازه در تشخیص آزمایشگاهی و درمان باشد.

References

1-Driscoll J.A. Brody S.L. Kollef M.H., *The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections*. Drugs. 2007; 67 :351—68.

2-Hauser AR, Rello J. Severe infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Norwell, MA: Kluwer Academic Press.2003; 31- 47.

3- Doring G. Pier Gerald B., *Vaccines and immunotherapy against Pseudomonas aeruginosa* Vaccine, 2008. 26: 1011—1024

4-Kloos W.E. Staphylococcus ; pp: 577- 617 In: *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial infections*.Collier L., Balows A., Sussman M., 9th ed ;Vol 2. Arnold Co . 1998; 577- 617

5-Ramos H.C. Rumbo M. Sirard J. C., *Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa.* TRENDS in Microbiology, 200412(11): 509-517.

6- Steiner T.S. *How Flagellin and Toll-Like Receptor 5 Contribute to Enteric Infection.* Infection and immunity, 2007. 75 (2); 545-552.

7- Lillehoj EP, Kim B.T, and Kim K.C. *Identification of Pseudomonas aeruginosa flagellin as an adhesin for Muc1 mucin*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.200;282: 751-756.

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 C.D. Montie T.C., *Cloning and Comparison of fliC Genes and Identification of Glycosylation in the Flagellin of Pseudomonas aeruginosa a-Type Strains.* Journal of Bacteriology, 1998. 180(12) ; 3209–3217.

10-Holder Ian Alan, *Pseudomonas immunotherapy: a historical overview.* Vaccine, 2004. 22 ;. 831–839.

11- Holder Ian A. Wheeler R. Montie T.C., *Flagellar Preparations from Pseudomonas aeruginosa: Animal Protection Studies.* Infection and immunity, 1982. 35(1): p. 276-280.

12-Sambrook J. Russell David W., Molecular Cloning, 3th ed; Vol: 2, C.S.H.L Press, New York , 2001

13- Wong Dominic W.S, The ABCs of Gene Cloning, 2nd ed. Springer, New York, 2006. *2nd ed*, 242

14- Winstanley C , Coulson MA , Wepner B , Morgan JAW , Hart CA , Flagellin gene and protein variation amongst clinical isolates of *Pseudornonas aeruginosa*, Microbiology .1996; 142, 2 1 45-2 1 5 1

15- Arora S , Dasgupta N, Lory S , Ramphal R Identification of Two Distinct Types of Flagellar Cap Proteins, FliD, in *Pseudomonas aeruginosa.* Infection and Immunity. 2000; 1474–1479

16- Driscoll J.A, Brody S.L, Kollef M.H. *The epidemiology, pathogenesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections*. Drugs. 2007; 67:351-368

17- Feldman M. Bryan R. Prince A. et al, *Role of Flagella in Pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa Pulmonary Infection*. Infection and Immunity. 1998. 66(1): 43-51

18- Do¨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. 104(26): 11020-11025

19-Winstanley C. Coulson M.A, Wepner B. et al , *Flagellin gene and protein variation amongst clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa.* Microbiology. 1996. 142: 2145-2151

20-Brimer C.D. Montie T.C. *Cloning and Comparison of fliC Genes and Identification of Glycosylation in the Flagellin of Pseudomonas aeruginosa a-Type Strains.* Journal of Bacteriology. 1998. 180(12): 3209-3217