

مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران

سال ۲ شماره ۱ بهار ۱۳۸۷، صفحات ۹-۱۴

کلونینگ و تعیین توالی ژن ساکول استافیلوکوکوس اورئوس

شاهو منبری، محمدرضا پورمند*، محمد حسن شیرازی، نادیا مردانی

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نویسنده رابط: محمدرضا پورمند، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن: ۸۸۹۵۴۹۱۰ mpourmand@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۱/۱۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

چکیده:

زمینه و اهداف: عفونت های طبیعی استافیلوکوکوسی و واکسن های حاوی سلول کامل باکتری توانایی کمی در برانگیختن آنتی بادی های میزبان دارند. در حالی که آنتی بادی های اختصاصی بر علیه آنتی ژن های نوترکیب استافیلوکوکوسی بسیار محافظت کننده هستند. ساکول آنتی ژنی است که به تازگی شناخته شده است و اطلاعات اندکی در مورد ویژگی های ساختاری و ایمونولوژیکی آن وجود دارد. هدف این مطالعه کلون کردن و تعیین توالی ژن ساکول استافیلوکوکوس اورئوس می باشد.

روش بررسی: پس از تهیه پرایمرهای اختصاصی قطعه ای از ژن مورد نظر با روش PCR تکثیر یافت و به همراه پلاسمید با آنزیم های *XhoI* و *NdeI*، به صورت انتهای چسبان تولید گردیدند. پس از ترانسفورم *pET21asacol* به درون باکتری حد واسط اشیریشیا کلی، پلاسمید نوترکیب با روش های هضم آنزیمی و تعیین ترادف ارزیابی شد. در نهایت ژن *sacol* با استفاده از نرم افزار مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: ژن ساکول به طول ۷۲۳ جفت باز با توالی صحیح، کلون گردید. هضم آنزیمی با موفقیت انجام شد بدین ترتیب که ساکول به طور کامل از پلاسمید جدا گردید. تعیین توالی شباهت ۱۰۰ درصد را با ژن الگوی اولیه از استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد. بررسی نرم افزاری حاکی از آن بود که این ژن پروتئینی به وزن مولکولی ۳۲ کیلو دالتون را کد کرده و دارای ۲۶۷ اسید آمینه می باشد که در انتهای N- ترمینال دارای یک C51 پپتیداز و در ساختار ثانویه خود دارای ۱ ماریپیچ آلفا و ۱۴ صفحه بتا می باشد.

نتیجه گیری: ساکول در اکثر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس حفظ شده است و ممکن است در اکثر عفونت های استافیلوکوکوسی نقش داشته باشد. مطالعه نقش ایمونولوژیک و بررسی تنظیم بیان آن در مطالعات آتی اهمیت آن را فاش خواهد ساخت.

کلید واژه ها: استافیلوکوکوس اورئوس، ساکول، کلونینگ

مقدمه:

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهمترین عوامل عفونت های بیمارستانی و عفونت های کسب شده از اجتماع است که می تواند عامل عفونت های مهمی همچون باکتری، اندوکاردیت، استئومیلیت، سندرم شوک توکسیک و عفونت های پوستی باشد (۱). مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس به پنی سیلین و متعاقب آن به متی سیلین و ونکومايسين (۲)، زمینه ساز چاره جویی برای یافتن راه حل های دیگری جهت درمان عفونت های ناشی از این پاتوژن، نظیر استفاده از آنتی بادی های اختصاصی و اکسیناسیون بوده است (۳،۴). ساخت انواع واکسن های پروتئینی، پلی ساکاریدی، *DNA* و یا ترکیبی از آنها می تواند نتایج ثمر بخشی در پی داشته باشد (۵). به منظور ساخت این واکسن ها پی بردن به خواص آنتی ژنیک و شیمیایی انواع آنتی ژن های بیان شده در این باکتری الزامی است (۶).

علیرغم اینکه از دهه گذشته فعالیت های چشم گیری در زمینه جستجو برای یافتن یک واکسن مناسب انجام شده است اما هنوز کلینیک فاقد یک واکسن مناسب با پتانسیل بالا می باشد. هر چند که واکسن های ساخته شده از مواد پلی ساکاریدی تقریباً می توانند از عفونت های باکتریایی پیشگیری کنند اما این واکسن ها در کل ایمنی اختصاصی سروتیپ را فعال می کنند و مربوط به سروتیپ می باشند (۵). بنابراین آنتی ژن های پروتئینی که تفاوت کمی در ترادف آنها وجود دارد و از ایزوله های کلینیکی مختلف جدا می گردند اگر به عنوان واکسن استفاده شوند می توانند ثمرات رضایت بخشی در پیشگیری از این عفونت ها به همراه داشته باشند. به منظور طراحی واکسن های زیر واحدی موثر و قابل مصرف در سراسر دنیا، لازم و ضروری است که این آنتی ژن ها شناسایی شوند و از نظر خواص آنتی ژنیک و اتصال به انواع پروتئین های پلاسما مورد ارزیابی قرار گیرند (۶).

واکنش دستگاه ایمنی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس بیماری زا می تواند به صورت تولید آنتی بادی های اختصاصی باشد (۷). یکی از روش های شناسایی این آنتی بادی ها استفاده از بیان مخزن های ژنی است. مطالعات اخیر پیرامون استافیلوکوکوس اورئوس منجر به شناسایی پروتئین هایی شده است که قادر به تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی بادی های اختصاصی می باشند (۸،۹). اخیراً به دنبال جستجوی آنتی ژن های عرضه شده در عفونت های انسانی به مجموعه ای از ژن ها پرداخته شده است که حداقل به عنوان راه حلی جهت کاهش ناقلین این پاتوژن

کاربرد دارد. دانشمندان متوجه شدند که ۶۰ پروتئین سطحی و ترشحی در استافیلوکوکوس اورئوس وجود دارند که پتانسیل تولید واکسن را دارند (۶). یکی از این آنتی ژن ها پروتئین سطحی ترشح شونده A2 می باشد. ژن بیان کننده این پروتئین ساکول بوده و متعلق به خانواده ژنی *Sca* می باشد که در اکثر سویه های استافیلوکوکوس حفظ شده است (۱۰). خانواده *Sca* حاوی ۹ پروتئین است که در بخش C- ترمینال دارای شباهت ۴۰ الی ۶۰ درصد با پروتئین اصلی این خانواده یعنی *ScaB* هستند. در حال حاضر اطلاعات اندکی در مورد خواص این پروتئین ها موجود می باشد (۱۰). ما در این تحقیق این هدف را دنبال می کنیم که ژن ساکول را با توالی صحیح کلون کنیم و از نظر ترادف ژنی بررسی نماییم تا بتوانیم آن را در مطالعات بعدی از نظر ساختاری، فیزیولوژیکی و ایمنی شناختی مورد بررسی قرار دهیم. اما قبل از هر کاری باید با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک سیستمی طراحی گردد که بتوان این ژن ۷۲۳ جفت بازی (بدون بخش سیگنال پپتیدی) را جداسازی و در مقیاس زیاد تولید کرد. با انجام موفقیت آمیز این همسانه سازی میتوان سیستمی را جهت ساخت پلاسمیدهای حاوی سایر ژن های این خانواده معرفی و در جهت بیان این ژن ها به کار برد.

مواد و روش ها:

تکثیر ژن *sacol*

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در ابتدا ژنوم سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس تحت گونه COL با استفاده از کیت (کیژن- آلمان) استخراج و به منظور کپی برداری از ژن *sacol* با به کارگیری یک جفت آغاز گر زیر مورد استفاده قرار گرفت:

5'gcg cgc cat atg tct gag caa gat aac tac ggt t 3'

5'gcg cgc ctc gag gtg aat gaa gtt ata acc agc ag 3'

باید در نظر داشت ژن *sacol* در ابتدای 5' خود دارای یک توالی ۸۱ جفت بازی است که بیان کننده سیگنال پپتیدی است که پروتئین بیان شده را در سویه وحشی به خارج از سلول ترشح می کند. بنابراین به منظور بیان صحیح این پروتئین در سویه توانا شده و عدم ترشح آن به محیط خارج از این باکتری آغازگر جلوی پس از ۸۱ نوکلوتید ابتدایی طراحی شد. به کمک آنزیم *Super Taq polymerase* (ژن فن آوران) از روی ژن اصلی کپی برداری شد.

مواد مورد نیاز جهت ازدیاد ژن عبارت بودند از الگو DNA ژنومیک ۲μl، پرایمر رفت و برگشت هر کدام (10μM)

در طول شب. یکی از کلونی های رشد کرده به درون محیط آبگوشت LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین تلقیح شد و به مدت ۵ ساعت در انکوباتور شیکر دار در دور ۳۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت.

تعیین توالی و بررسی هضم آنزیمی

پس از تکثیر و استخراج پلاسمید (کیت کیاژن - آلمان) برای تأیید حضور قطعه ژنی *sacol*، پلاسمید نوترکیب با استفاده از آنزیم های برش دهنده *XhoI* و *NdeI* مورد بررسی هضم آنزیمی قرار گرفت. برای اطمینان از عدم بروز موتاسیون و صحت ترادف کاست بیانی، پلاسمید استخراج شده توسط روش سکانسینگ مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش های تعیین توالی DNA بر اساس روش Sanger و توسط شرکت ژن فناوران انجام گرفت. در تعیین توالی DNA از کیت BigDye Terminator v3.1 و Cycle Sequencing Kit کمپانی Applied Biosystems و دستگاه ABI Sequence Analyzer 3130xl همان کمپانی استفاده شد. توالی هر رشته DNA با استفاده از کروماتوگرام مربوطه و توسط نرم افزارهای Chromas (Technelysium) استفاده شد. توالی هر رشته DNA با استفاده از کروماتوگرام مورد بررسی دقیق قرار گرفت. بازهای سؤال برانگیز با بررسی دقیق کروماتوگرام و مقایسه با کروماتوگرام توالی رشته معکوس مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور آنالیز و مقایسه تمامی تغییرات ژنتیکی از نرم افزار Chromaspro (Technelysium) استفاده شد.

یافته ها:

نتایج حاصل از واکنش PCR (شکل ۱) نشان داد که این ژن پس از حذف توالی کد کننده سیگنال پپتید اولیه، ۷۲۳ جفت باز طول دارد. همچنین آنالیز هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pET21asacol با آنزیم های *XhoI* و *NdeI* (شکل ۲) نمایان ساخت که ژن *sacol* به طور صحیح در کاست بیانی مور نظر قرار گرفته است. تعیین ترادف سکانس ژن *sacol* نمایانگر آن بود که کاست بیانی به همراه پروموتور T7، محل اتصال ریوزوم، کدون آغازی (ATG)، قطعه ژن (*sacol*)، برچسب هیستیدینی (6X His tag) و سکانس های پایانی، در ترادف مناسب و به صورت پشت سرهم قرار گرفته اند. بررسی شباهت این ژن با سایر ژن های موجود در NCBI Genbank database نشان داد که ژن *sacol* در اکثر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس حفظ شده است. بررسی نرم افزاری حاکی از آن بود که این ژن پروتئینی به وزن مولکولی ۳۲ دالتون را کد کرده و دارای ۲۶۷ اسید آمینه می باشد که در انتهای

۰.۵μl dNTPs (10mM)، ۲μl بافر ۱۰ μl، کلرید منیزیم ۳μl، آب مقطر استریل ۷۲/۷ μl و آنزیم *Taq* (Super Taq polymerase) (۰/۳ μl) [5U/μl]. تمامی مواد به کار رفته در واکنش PCR از شرکت ژن فن آوران تهیه گردیدند. انجام مراحل PCR با مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد (Hot start) آغاز گردیده و با انجام ۳۰ سیکل متوالی (۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه) به اتمام رسید. ژل آگارز (ژن فن آوران) ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید در الکتروفورز برای مشاهده محصول تکثیر شده کپی برداری مورد استفاده قرار گرفت.

آنزیم های محدودالایتر و تهیه پلاسمید نوترکیب

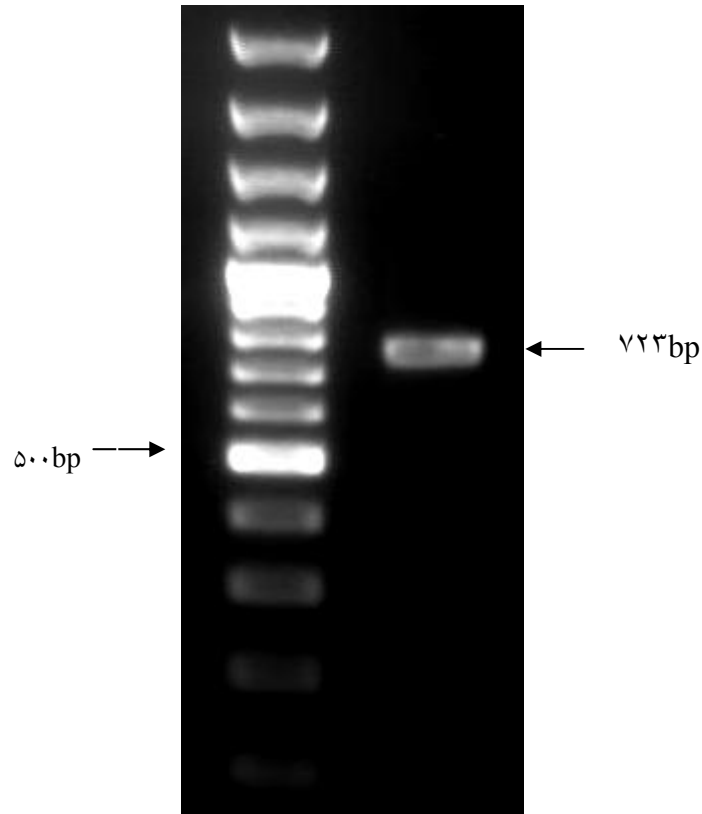
پس از شستشوی محصول کپی شده (کیت کیاژن-آلمان)، آن را به همراه پلاسمید pET21a(+) (novagen) توسط دو آنزیم برش دهنده *XhoI* و *NdeI* (ژن فن آوران-fermentase) به صورت انتهاهای چسبان به دست آورده سپس توسط آنزیم T4 (Roche) ligase به یکدیگر الحاق گردیدند. pET21a(+) دارای ژن مقاومت به آمپی سیلین و پروموتور T7 می باشد. این وکتور حاوی اپرون *lac* بوده که توسط القاگر IPTG فعال می گردد. طراحی آغازگرها به گونه ای بوده است که در طرف 5' آنها سکانس های برش *XhoI* و *NdeI* قرار داشت. همچنین کدون آغازی ATG در محل *NdeI* قرار گرفت تا ژن مربوطه به طور همخوان در امتداد برچسب هیستیدینی (6XHis-tag) و سکانس پایانی (T7terminator) قرار گیرد.

ترانسفر ماسیون

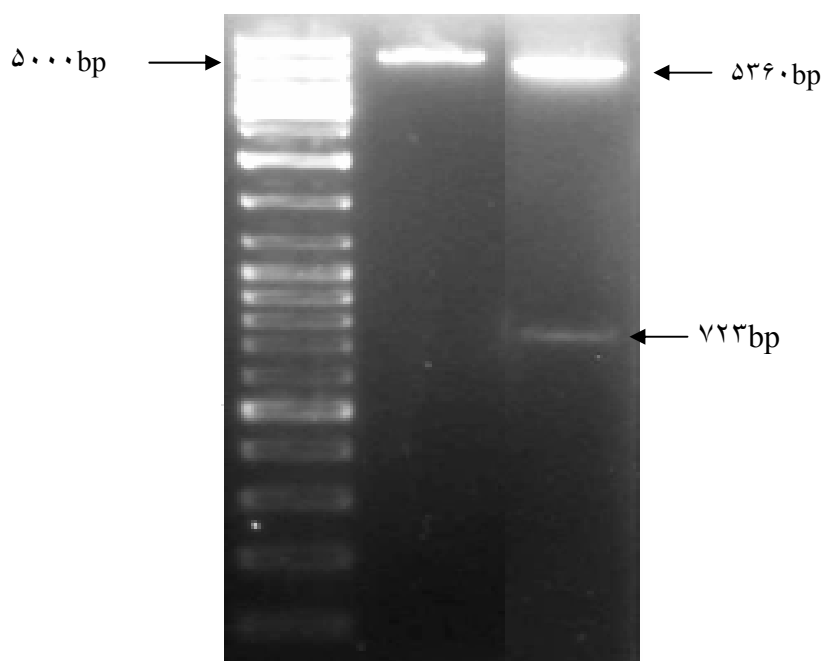
پلاسمید نوترکیب pET21asacol به درون باکتری توانا شده *E. coli* TOP10 ترانسفرم شد. ترانسفر ماسیون به روش شوک حرارتی انجام گردید (۶). شرایط ترانسفر ماسیون به این ترتیب بود: قرار دادن باکتری مستعد شده بر روی یخ به مدت ۱۰ دقیقه، انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل این باکتری، قرار دادن باکتری *E. coli* حاوی وکتور بر روی یخ به مدت ۲۰ دقیقه، شوک حرارتی در ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه، اضافه کردن محیط آبگوشت LB به ویال حاوی باکتری به میزان ۹۰۰ لاند، انکوبه کردن در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت، رسوب دادن باکتری با استفاده از سانتریفیوژ در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه، کشت دادن پلت باکتری باقی مانده بر روی محیط کشت لوری-بیرتانی آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و انکوبه در ۳۷ درجه سانتی گراد

استافیلوکوکوس اورئوس به طور کامل حفظ شده است. در نهایت ما توانستیم برای اولین بار با استفاده از پلاسمید pET21a این ژن را با توالی صحیح کلون کنیم.

N- ترمینال دارای یک C51 پپتیداز و در ساختار ثانویه خود دارای ۱ مارپیچ آلفا و ۱۴ صفحه بتا می باشد. این پروتئین در ابتدای ۵' خود دارای یک سیگنال پپتیداز بوده و در انتهای N- ترمینال دارای یک CHAP domain بوده که در همه سویه های



شکل ۱: محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ستون ۱: سایز مارکر (fermentase)، ستون ۲: محصول PCR. ۷۲۳ جفت باز.



شکل ۲: بررسی نقشه آنزیمی PET21a sacol و تأیید آن توسط آنزیم های محدود کننده بر روی ژل آگارز ۱٪ ستون ۱: ساین مارکر (fermentase)، ستون ۲: پلاسمید اولیه PET21a بریده شده توسط آنزیم های *XhoI, NdeI* فاقد قطعه کلون شده، ستون ۳: وکتور *Pet21a* حاوی ژن *sacol* هضم شده با آنزیم های *XhoI, NdeI*.

بحث:

بالایی حفظ شده است و می توانند به عنوان کاندیداهای مهمی برای ساخت واکسن مطرح شوند (۱۰). یکی از ژن هایی که هم در مقاله ETZ و هم در خانواده Sca می توان به آن اشاره کرد ژن ساکول می باشد (۶،۱۰). در اینجا بهتر است به ساختار پروتئینی این ژن توجه ویژه داشت چون کلونینگ وسیله ای برای رسیدن به پروتئین می باشد. باید دانست که اعضای خانواده Sca در استافیلوکوکوس اورئوس فاقد LPXTG در ردیف اسید آمینه ای خود می باشند، با این حال بدلیل وجود پپتید سیگنال در انتهای N-ترمینال همه این خانواده ممکن است این پروتئین ها ترشحی و یا در سطح سلول باکتری عرضه شوند. شاید بتوان خانواده Sca را به عنوان زیر مجموعه ای از خانواده بزرگ پروتئین MSCRAMMS لحاظ کرد. این خانواده نقش حیاتی در کلونیزه کردن استافیلوکوکوس اورئوس روی سلول های میزبان دارد (۱۰). ما در این مطالعه با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک توانستیم یکی از ژن های این خانواده را به نام ساکول شناسایی و کلون کنیم. این مطالعه تجربی بر اساس این فرضیه استوار است که این پروتئین و سایر پروتئین های این خانواده می توانند سیستم ایمنی انسان را تحریک نموده و منجر به تولید آنتی بادی های اختصاصی شوند. به منظور بررسی خواص ایمونولوژیکی این پروتئین باید در

در سال ۲۰۰۵، Gill و همکارانش توانستند فاکتورهای ویروالانس و مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس را در مقایسه با سایر سویه هایی از این باکتری ها که از پاتوژن کمتری برخوردار بودند، تعیین کنند. همچنین آن ها توانستند ژنوم کامل استافیلوکوکوس اورئوس تحت گونه COL را تعیین توالی نمایند (۱۲). یکی از هزاران ژن این سویه ساکول ۲۲۹۱ می باشد که در زمینه کارکرد آن در استافیلوکوکوس اورئوس تحقیقاتی صورت نگرفته است. به منظور شروعی جدی برای یافتن خواص این ژن در مرحله اول، کلونینگ آن در آزمایشگاه مولکولی گروه پاتوبیولوژی صورت گرفت. با مقایسه توالی این ژن به روش بیوانفورماتیک میتوان به برخی ویژگی های ژن پی برد ولی باید کارکرد آن را در محیط آزمایشگاه نشان داد. در سال ۲۰۰۲، Etz و همکارانش با استفاده از مخزن ژنی استافیلوکوکوس اورئوس و بیان آنتی ژن های سطحی و ترشحی و در معرض قرار دادن آنها با سرم بیماران ۶۰ آنتی ژن پروتئینی را به عنوان کاندیداهای مهم جهت استفاده در واکسن هایی که در آینده ساخته خواهند شد معرفی کردند (۶). مطالعات انجام شده حاکی از آن است که در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس خانواده پروتئینی Sca در حد

ساکول در اکثر سویه های استافیلوکوکوس اورئوس حفظ شده است و ممکن است در اکثر عفونت های استافیلوکوکوسی نقش داشته باشد. مطالعه نقش ایمونولوژیک و بررسی تنظیم بیان آن در مطالعات آتی اهمیت آن را فاش خواهد ساخت.

تقدیر و تشکر:

این تحقیق در قالب یک طرح تحقیقاتی (۸۷-۰۱-۲۷-۶۸۲۰) در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۸۷ انجام شد و کلیه هزینه های بررسی حاضر، توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران تامین گردیده است. ضمناً بخشی از نتایج پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد در دانشکده بهداشت می باشد.

ابتدا به صورت خالص بیان شده و در معرض فاکتورهای سرمی قرار گیرد. اولین مرحله طراحی سیستمی بود که بتوان ژن مورد نظر را در ترادف صحیح بیان و خالص سازی کرد. پروتئین بیان شده توسط این ژن دارای ۲۶۷ اسید آمینه است که با حذف سیگنال پپتید ابتدای به ۲۴۰ اسید آمینه تقلیل می یابد. در مطالعات آینده می توان با بیان این پروتئین در جهت شناخت خواص ایمونولوژیکی، فیزیولوژیکی، داشتن نقش در پاتوژنیسیته، فرایندهای سلولی و بررسی خاصیت چسبندگی به فاکتورهای سرمی نظیر لاکتوفرین، فیبرینوژن، کلاژن و... بهره ببریم.

نتیجه گیری:

فهرست مراجع:

- Weichhart T, Horky M. Functional Selection of Vaccine Candidate Peptides from *Staphylococcus aureus* Whole-Genome Expression Libraries In Vitro. *Infect immun* 2003; **71**(8): 4633-4641.
- MMWR. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; **51**: 565-7
- Josefsson E, Hartford O, O'Brien L, Patti JM, Foster T. Protection against experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *J infect Dis* 2001; **184**: 1572-80.
- Mckenney D, Pouliot KL, Wang Y, Murthy V, et al. Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo-expressed antigen. *Science* 1999; **284**: 1523-7.
- Foster TJ. Potential for vaccination against infections caused by *Staphylococcus aureus* Vaccine. *Vaccine* 1991; **9**(4):221-7.
- Etz H, Minh DB, Henics T, Dryla A, Winkler B, Triska C, Boyd AP. Identification of in vivo expressed vaccine candidate antigens from *Staphylococcus aureus*. *Applied biological sciences* 2002; **99**(10): 6573-6578.
- Shinefield H, Black S, Fattom A, Horwith G, Rasgon S, Ordonez J, Yeoh H. Use of a *Staphylococcus aureus* conjugate vaccine in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 2002; **346**: 491-496.
- Brouillette E, Lacasse P, Shkreta L, Belanger J, Grondin G, Diarra MS, Fournier S and Talbot BG. DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 2002; **20**: 2348-2357.
- Schenning T, Heimdahl A, Coster K, Flock JI. Immunization with fibronectin binding protein from *Staphylococcus aureus* protects against experimental endocarditis in rats. *Microb Pathog* 1993; **15**: 227-236.
- Pourmand MR, Foster SJ. A novel bioinformatic approach for *Staphylococcal* vaccine development. *tumj* 2006; sep: 19-27.
- Stevens DL. Community-acquired *Staphylococcus aureus* infections: increasing virulence and emerging methicillin resistance in the new millennium. *Curr Opin Infect Dis* 2003; **16**: 189-191.
- Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, DeBoy RT, Ravel J. Insights on Evolution of Virulence and Resistance from the Complete Genome Analysis of an Early Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strain and a Biofilm-Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis* Strain. *J. Bacteriol* 2005; **187**(7): 2426-2438.