مجله میکروب 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 واهداف: 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 *Nde*I و *Xho*I ، به صورت انتهاهای چسبان تولید گردیدند. پس از ترانسفورم pET21asacol به درون باکتری حد واسط اشریشیا 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 ازاستافیلوکوکوس 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 مارپیچ آلفا و۱۴صفحه بتا می باشد.

نتیجه گیری: *ساکول* در اکثر سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* حفظ شده است وممکن 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 باکتریمی، 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 ونکومایسین(۲)، زمینه ساز چاره جویی برای یافتن راه حل های دیگری جهت درمان عفونت های ناشی از این پاتوژن، نظیراستفاده از آنتی بادی های اختصاصی و واکسیناسیون بوده است (۳،۴). ساخت انواع واکسن های پروتئینی، پلی ساکاریدی، *DNA* ویا 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 وشیمیایی 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 تقریبا 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). اخیرا 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 نظرترادف ژنی بررسی نماییم تا بتوانیم آن را در مطالعات بعدی ازنظرساختاری، 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 درمقیاس زیاد تولید کرد. با انجام موفقیت آمیزاین 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 (کیاژن- آلمان) استخراج و به منظور کپی برداری از ژن *sacol* با به کارگیری یک جفت آغاز گر زیر مورد استفاده قرار گرفت:

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

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

باید درنظر 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 جلوبر 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)

۵µl، ۲µl dNTPs (10mM)، بافر µl ۱۰، کلرید منیزیم ۳µl، آب مقطر استریل µl ۷۲/۷ و آنزیم *Taq* (Super 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 محدودالاثر 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 *NdeI* و *XhoI* (**ژن فن آوران**- fermentase)به صورت انتهاهای چسبان به دست آورده سپس توسط آنزیم T4 ligase (Roche) به یکدیگر الحاق گردیدند. pET21a(+) دارای ژن مقاومت به آمپی سیلین و پروموتر T7 می باشد. این وکتور حاوی اپرون *lac* بوده **که** توسط القاگر IPTG فعال می گردد. طراحی آغازگرها به گونه ای بوده است که درطرف '5 آنها سکانس های برش *NdeI* و *XhoI* 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.

ترانسفرماسیون

پلاسمید نوترکیب pET21a*sacol* به درون باکتری توانا شده *E. coli*TOP10 ترانسفرم شد. ترانسفرماسیون به روش شوک حرارتی انجام گردید (۶). شرایط ترانسفرماسیون 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 لاندا، انکوبه کردن در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت، رسوب دادن باکتری با استفاده از سانتریفیوژدر ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه، کشت دادن پلت باکتری باقی مانده برروی محیط کشت لوری-برتانی آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین و انکوبه در ۳۷ درجه سانتی گراد در طول شب. یکی ازکلونی 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.

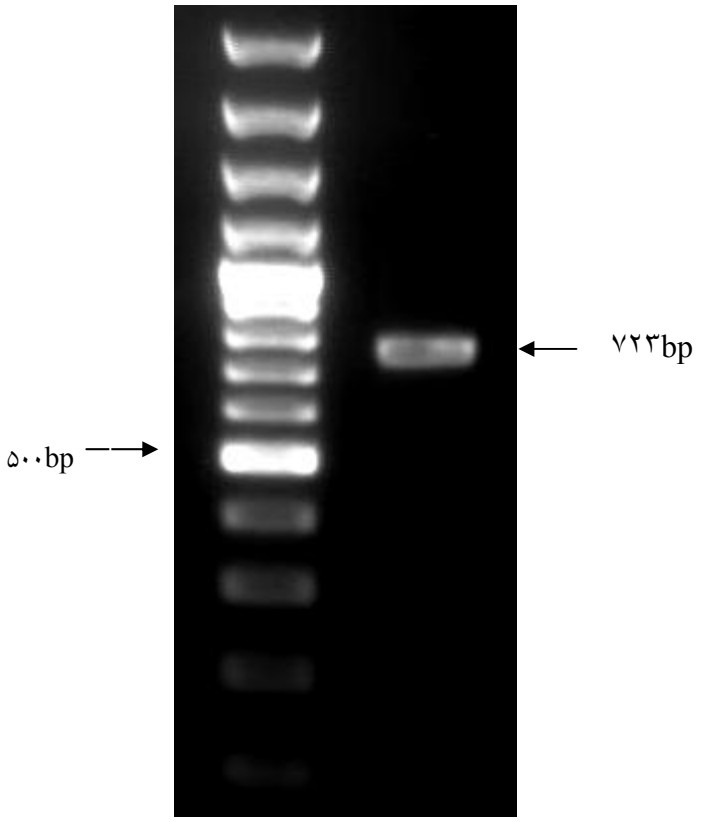
تعیین توالی و بررسی هضم آنزیمی

پس ازتکثیر و استخراج پلاسمید (کیت کیاژن - آلمان) برای تائید حضور قطعه ژنی *sacol* ، پلاسمید نوترکیب با استفاده از آنزیم های برش دهنده *NdeI* و *XhoI* 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 قرارگرفت. 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 Cycle Sequencing Kit کمپانی Applied Biosystems و دستگاهABI Sequence Analyzer 3130xl همان کمپانی استفاده شد. توالی هر رشته DNA با استفاده از کروماتوگرام مربوطه و توسط نرم افزارهای Chromas (Technelysium) مورد بررسی دقیق قرار گرفت. بازهای سئوال 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.

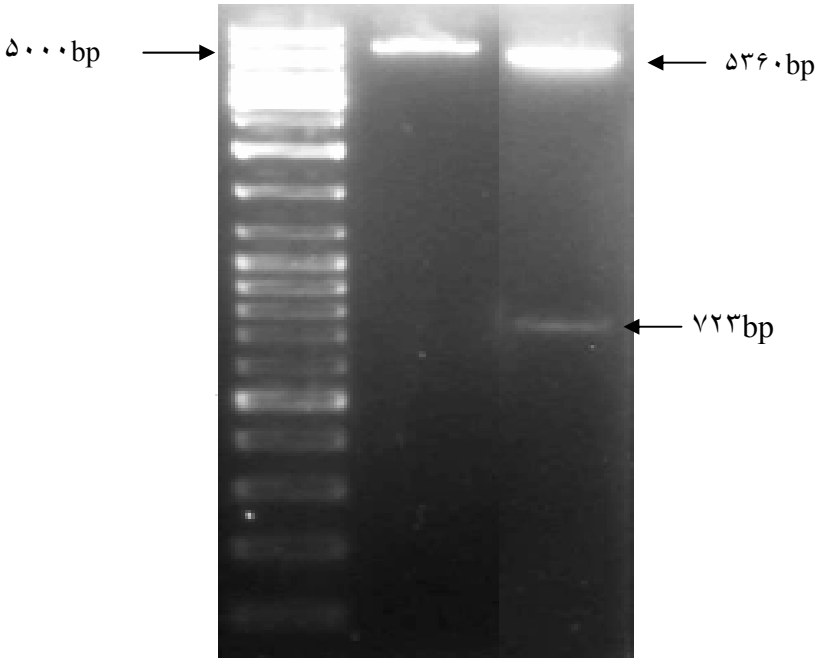
یافته ها:

نتایج حاصل ازواکنش PCR (شکل۱) 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 *NdeI* و *XhoI* (شکل۲) نمایان ساخت که ژن *sacol* به طورصحیح 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 ریبوزوم ، 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

N- ترمینال دارای یک C51 پپتیداز و در ساختار ثانویه خود دارای ۱ مارپیچ آلفا و۱۴صفحه بتا می باشد. این پروتئین در ابتدای '۵ خود دارای یک سیگنال پپتیداز بوده ودر انتهای N- ترمینال دارای یک CHAP domain بوده که در همه سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس به طور کامل حفظ شده است*. در نهایت ما توانستیم برای اولین باربا استفاده از پلاسمید pET21a این ژن را با توالی صحیح کلون کنیم.



شکل۱ : محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد. ستون۱: سایز مارکر(fermentase)، ستون۲: محصول PCR، ۷۲۳ جفت باز.



شکل۲:بررسی نقشه آنزیمی PET21a*sacol* و تائید آن توسط آنزیم های محدود کننده بر روی ژل آگارز ۱٪ ستون۱: سایزمارکر(fermentase)، ستون۲: پلاسمید اولیه PET21a بریده شده توسط آنزیم های *Xho1,Nde1* فاقد قطعه کلون شده، ستون۳: وکتور Pet21aحاوی ژن *sacol* هضم شده با آنزیم های *XhoI* ,*NdeI*.

بحث:

در سال ۲۰۰۵، Gill و همکارانش توانستند فاکتورهای ویرولانس و مقاومت آنتی بیوتیکی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* را در مقایسه با سایر سویه هایی از این باکتری ها که از پاتوژنز 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 2002، Etz و همکارانش با استفاده از مخزن ژنی استافیلوکوکوس اورئوس و بیان آنتی ژن های سطحی وترشحی ودر 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 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 وسایر 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

ابتدا به صورت خالص بیان شده و در معرض فاکتورهای سرمی قرار گیرد. اولین مرحله طراحی سیستمی بود که بتوان ژن مورد نظر را درترادف 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 پاتوژنیسیتی، فرایندهای سلولی و بررسی خاصیت چسبندگی به فاکتورهای سرمی نظیر لاکتوفرین، فیبرینوژن، کلاژن و... بهره ببریم.

نتیجه گیری:

ساکول در اکثر سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* حفظ شده است وممکن 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 وکلیه هزینه های بررسی حاضر، توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران تامین گردیده است. ضمنا بخشی از نتایج پایان نامه دانشجوئی کارشناسی ارشد در دانشکده بهداشت می باشد.

فهرست مراجع:

1. 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.
2. MMWR. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51: 565-7
3. 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.
4. 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.
5. Foster TJ. Potential for vaccination against infections caused by *Staphylococcus aureus* Vaccine. *Vaccine* 1991; **9**(4):221-7.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Schennings 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.
10. Pourmand MR, Foster SJ. A novel bioinformatic approach for Staohylococcal vaccine development. *tumj* 2006; sep: 19-27.
11. 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.
12. 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.