شناسایی ملکولی کمپیلوباکترژژونی با استفاده از یک توالی اختصاصی

شکوفه حاجتی[1]، محمد حسن شیرازی[2*]، داود افشار[3]، مجید مقبلی حسین آبادی[4] ، امین معظمی[5]، سارا حاجی خانی[6]

1. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی دانشگاه آزاد دامغان
2. میکروب شناس، بخش میکروب شناسی گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
3. دانشجوی دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
4. میکروب شناس، گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد دامغان
5. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی دانشگاه آزاد اراک
6. کارشناس، بخش میکروب شناسی گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

*** نشانی برای مکاتبه:** تهران، میدان انقلاب، دانشگاه علوم پزشکی تهران، گروه میکروب شناسی، تلفن: 02188953021 ، mhshirazi@tums.ac.ir

دریافت مقاله: فروردین نود و دو پذیرش برای چاپ: تیر نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: *کمپیلوباکتر ژژونی یکی از عوامل شایع اسهال در انسان می باشد بنابراین شناسایی سریع و اختصاصی این باکتری در نمونه های مبتلایان به انتریت اهمیت زیادی در تشخیص و درمان بیماری دارد. در این تحقیق، شناسایی لوکوس اختصاصی کمپیلوباکتر ژژونی مورد مطالعه قرار گرفت.*

روش کار: *برای یافتن لوکوس اختصاصی در کمپیلوباکتر ژژونی از روش هم ردیفی چند گانه و جهت طراحی پرایمرهای اختصاصی گونه کمپیلوباکترژژونی از نرم افزار پرایمر 3 استفاده شد. استخراج DNA با روش STET تغییر یافته و واکنش PCR مطابق روش معمول انجام گردید.*

یافته ها: *نتایج روش هم ردیفی چندگانه یک لوکوس اختصاصی و حفاظت شده ای را در ژنوم کمپیلوباکتر ژژونی نشان داد. با طراحی پرایمر برای این لوکوس آمپلیکون اختصاصی مشاهده گردید.*

نتیجه گیری: *با توجه به اینکه ژن های بیماری زایی و ژن هیپورات اختصاصی کمپیلوباکترژژونی نیستند استفاده از لوکوس اختصاصی کمپیلوباکترژژونی برای تشخیص قطعی این گونه قابل اعتماد می باشد.*

واژگان کلیدی: ***کمپیلوباکترژژونی، انتریت، PCR، پرایمر اختصاصی***

مقدمه

کمپیلوباکتر ژژونی یکی از گونه های خانواده کمپیلوباکتریاسه بوده و از عوامل اصلی انتریت انسان در دنیا محسوب می شود(2و1). علاوه بر انتریت عوارضی همانند سندرم گیلن باره و آرتریت واکنشی نیز بدنبال انتریت ناشی از این باکتری گزارش شده است(6-3). لذا اهمیت بهداشتی این باکتری بسیار بالا بوده و سالانه مطالعات فراوانی بر روی این باکتری صورت می گیرد. با توجه به مطالب عنوان شده می توان گفت که تشخیص اختصاصی و فوری انتریت کمپیلوباکتریایی اهمیت بالایی دارد. از دلایلی که باعث می شود آزمایشگاه ها و بیمارستان های کشور در تشخیص این باکتری در نمونه های انتریت موفق عمل نکنند می توان به شرایط رشد کند(کمتر از 72 ساعت امکان پذیر نیست) و هزینه بر این باکتری اشاره کرد چرا که باکتری فوق الذکر یک باکتری میکروآئروفیل است و برای فراهم نمودن شرایط رشد آن بایستی از سیستم های گازپک نوع C استفاده گردد(9-7) که هزینه بالایی داشته و مقرون به صرفه نیست. لذا اکثر بیمارستان ها و آزمایشگاه های تشخیص طبی کشور شناسایی کمپیلوباکتر را در پروتوکل تشخیصی خود جای نمی دهند. لذا به دنبال عدم تشخیص قطعی عامل بیماری طبیعی است که درمان نامناسبی اتخاذ شده و بیماری به خوبی درمان نگردد. با توجه به وجود عوارض عنوان شده می توان بیان کرد که تشخیص سریع انتریت ناشی از کمپیلوباکترژژونی از ارزش بسیار بالایی برخوردار است و با توجه به مشکل بودن کشت این باکتری اهمیت روش های ملکولی در شناسایی کمپیلوباکترژژونی پرواضح می باشد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز یکی از روش های ساده ملکولی است که کارایی بالایی در شناسایی پاتوژنهای روده ای دارد. در این مطالعه یک واکنش زنجیره ای پلیمراز با پرایمر های اختصاصی برای کمپیلوباکتر ژژونی طراحی گردید.

روش کار

در این مطالعه از یک گونه کمپیلوباکترژژونی استفاده شد که از پژوهش گاه کبد و گوارش دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه شده بود. برای تائید فنوتیپی باکتری از رنگ آمیزی گرم، تست های اکسیداز، کاتالاز، تست TSI و هیدرولیز هیپورات استفاده شد(10). علاوه بر این از ژنوم اشریشیا کلای O157 برای انجام تست اختصاصیت پرایمرها استفاده گردید.

استخراج ژنوم به روش جوشاندن باکتری در STET انجام شد. در این روش بعد از کشت کمپیلوباکترژژونی در محیط مایع BHI، تحت شرایط میکروآئروفیل(با استفاده از گاز پک نوع C) و در دمای 42 ° C انکوبه گردید. بعد از 24 ساعت، 2 میلی لیتر از این محیط به میکروتیوب اضافه شده و به مدت 5 دقیقه با دور 5000RPM سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شده و به رسوب حاصله 300 میکرولیتر محلول STET (Tris- HCl (10mM (PH=8))1.57 g , NaCl (0.1 M)0.58g, EDTA(1 Mm)O.O36G, Triton X100(%5 (v/v)) اضافه گردیده و به مدت 5 دقیقه در آب جوش جوشانده شد. بعد از 5 دقیقه میکروتیوب مورد نظر به مدت 10 دقیقه با دور 10000 RPM سانتریفیوژ شده و محلول رویی به یک میکروتیوب استریل دیگری انتقال داده شد. سپس 3 برابر آن اتانول مطلق سرد(20- درجه سانتیگراد) به آن اضافه کرده و 30 دقیقه در دمای 20- ° C قرار داده شد. در نهایت به مدت 10 دقیقه با دور 13000RPM سانتریفیوژ کرده و محلول رویی دور ریخته شد. بعد از خشک شدن میکروتیوب 50 میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شده و در دمای 20- ° C نگهداری شد.

توالی ژنی مربوط به یک پروتئین پری پلاسمیک بر اساس نتایج بلاست نوکلئوتیدی برای طراحی پرایمر انتخاب شد. با استفاده از نرم افزار پرایمر 3 (11) یک جفت پرایمر با توالی F- GGTGTAGCGATTGAAAAAGA' و R- GCAAAAGCAAAGGGACCA طراحی و تحت شرایط In Silico آنالیز و مورد تائید قرار گرفت. آمپلیکون حاصله از این پرایمرها 308 bp طراحی شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز با افزودن 15.7µl D.D. Water، Buffer 2.5µl، 1 µl Mgcl2، 2.5 µl dNTP، 0/5 µl Primer F، Primer R 0/5 µl ، 2µl DNA و 0/ 3 µl Taq DNA polymerase در میکروتیوب استریل 0/2 و در شرایط شامل یک مرحله واسرشت سازی در 94°C به مدت 5 دقیقه، 35 چرخه تکثیر DNA (واسرشت سازی در 94°C به مدت 1 دقیقه، اتصال پرایمرها در 57 °C به مدت 50 ثانیه، مرحله طویل شدن در 72 ° C به مدت 30 ثانیه) و یک مرحله طویل شدن نهایی در 72° C به مدت 10دقیقه در ترموسایکلر اپندورف انجام گردید.

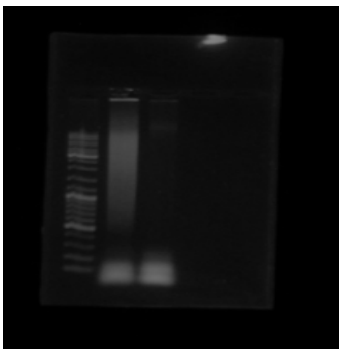
برای انجام الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل 5 میکرولیتر از محصول PCR با 1 میکرولیتر Read gel مخلوط و در چاهک ژل 1 درصد قرار داده شد. الکتروفورز با ولتاژ 80 به مدت 45 دقیقه انجام گرفت. بعد از الکتروفورز به وسیله دستگاه ژل داکیومنتیشن از ژل عکسبرداری انجام شد.

یافته ها

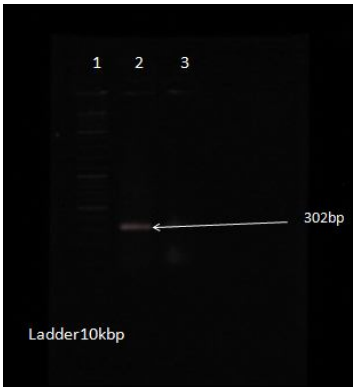
هم ردیفی چندگانه توالی های مربوط به توالی کامل 11 ژنوم کمپیلوباکتر ژژونی که در بانک های ژنی ثبت شده اند یک لوکوس مشترک و اختصاصی مربوط به گونه را نشان داد که در جدول 1 نشان داده شده است. از این لوکوس در طراحی پرایمر استفاده شد. در استخراج DNA با روش STET تغییر یافته مقدار مناسبی از DNA بدست آمد. صحت وجود DNA استخراج شده، با الکتروفورز روی ژل آگارز تائید گردید (شکل 1). باند اختصاصی در غلظت 1 µl Mgcl2 و 0/5 µl از هر کدام از پرایمرها و دمای مرحله اتصال 57 °C بدست آمد(شکل 2).

جدول 1. لوکوس های مشترک در بین 11 ژنوم کامل کمپیلوباکتر ژژونی.

کد دسترسی ژنوم های کمپیلوباکتر ژژونی در بانک های ژنی	لوکوس مشترک
NC_003912<	924345 تا 924038
NC_009707<	804639 تا 804332
NC_008787<	846637 تا 846330
NC_009839<	852707 تا 852400
NC_017279<	849014 تا 848707
NC_014802<	881370 تا 881063
NC_017280<	846897 تا 846590
NC_002163<	846159 تا 845852
NC_018521<	846159 تا 845852
NC_018709<	846992 تا 846685
NC_017281<	878795 تا 878488



شکل 1. تصویر الکتروفورز محصول استخراج ژنوم با روش STET



شکل 2. نتایج واکنش زنجیره ای پلیمراز. چاهک شماره 1 مارکر 10Kbp، چاهک شماره 2 باند مربوط به کمپیلوباکتر ژژونی(308bp) و چاهک شماره 3 مربوط به الکتروفورز محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز اشریشیا کلای O157 است.

بحث

کمپیلوباکترژژونی یکی از عوامل اصلی انتریت در دنیا محسوب می شود علاوه بر این، عوارضی مانند سندرم گیلن باره و آرتریت واکنشی نیز به دنبال انتریت های ناشی از این باکتری بارها گزارش شده است(2و1). در این مطالعه یک واکنش زنجیره ای پلیمراز بسیار اختصاصی برای شناسایی کمپیلوباکترژژونی طراحی گردید. به طوری که انجام PCR با پرایمر های طراحی شده در این مطالعه با ژنوم باکتری های دیگر هیچ واکنش مثبتی نداشت. در بسیاری از مطالعات برای شناسایی کمپیلوباکترژژونی از ژن های دیگری همانند ژن مربوط به هیپورات استفاده شده است(4و3) ولی در این مطالعه با یک آنالیز هم ردیفی چندگانه، توالی از کمپیلوباکتر ژژونی بدست آمد که علاوه بر اختصاصیت به گونه کمپیلوباکترژژونی در تمام ژنوم های تعیین توالی شده کمپیلوباکترژژونی نیز حفاظت شده بود. لذا ناحیه مورد نظر جهت طراحی پرایمر مورد استفاده قرار گرفت. آنالیز پرایمرها در شرایط In Silico نشان داد که پرایمر های طراحی شده اختصاصیت بالایی به کمپیلوباکترژژونی داشتند. لذا در بسیاری از موارد یافتن یک توالی ژنی اختصاصی گونه و محافظت شده برای انجام یک واکنش زنجیره ای پلیمراز الزامی است. این مسئله علاوه بر کمپیلوباکتر ژژونی برای سایر باکتری ها همانند شیگلا و سالمونلا و بسیاری از باکتری های دیگر نیز صدق می کند. افشار و هم کاران در مطالعه ای بر روی شیگلا بجای استفاده از ژن های ویرولانس برای شناسایی این باکتری، در انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز، از یک توالی بسیار حفاظت شده و اختصاصی استفاده کردند(5). نتایج این مطالعه همانند مطالعه ما نشان داد که اختصاصیت پرایمرها با طراحی آنها بر اساس توالی اختصاصی مطابقت دارد. کمپیلوباکترژژونی دارای دو زیرگونه ژژونی و دویلئی است.

در برخی مطالعات با انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز فقط یکی از این زیرگونه ها مورد شناسایی قرار گرفته است(7و6) ولی در مطالعه ما این نکته در طراحی پرایمر مورد توجه قرار گرفت بنابراین پرایمری که طراحی شد علاوه بر شناسایی زیر گونه ژژونی توانایی شناسایی زیر گونه دویلئی را نیز داشت. لذا طراحی پرایمرهای دیگر برای تشخیص زیر گونه دیگر منتفی می شود. با یافته های حاصل از این مطالعه می توان عنوان کرد که روش شناسایی ملکولی در صورت اختصاصی بودن پرایمرهای مورد استفاده قابل اعتماد بوده و در برخی موارد مناسب تر از کشت می باشد.

نتیجه گیری

با نتایجی که در این مطالعه بدست آمد مشخص شد که پرایمرهای جدید با ویژگی و اختصاصیت بسیار بالا به کمپیلوباکترژژونی، در تشخیص های تحقیقاتی و بالینی قابل اعتماد بوده و تکرار پذیری بالایی دارند.

REFERENCES

1. Champion, Olivia L., et al. Comparative phylogenomics of the food-borne pathogen Campylobacter jejuni reveals genetic markers predictive of infection source. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102.44 (2005): 16043-16048.

2. Wai, Sun Nyunt, et al. Construction of a ferritin□deficient mutant of Campylobacter jejuni: contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. Molecular microbiology 20.6 (2006): 1127-1134.

3.Koga, Michiaki, et al. Comprehensive analysis of bacterial risk factors for the development of Guillain-Barré syndrome after Campylobacter jejuni enteritis. Journal of Infectious Diseases 193.4 (2006): 547-555.

4. Takahashi, Masaki, et al. Epidemiology of Campylobacter jejuni isolated from patients with Guillain-Barré and Fisher syndromes in Japan. Journal of clinical microbiology 43.1 (2005): 335-339.

5. Young, Kathryn T., Lindsay M. Davis, and Victor J. DiRita. Campylobacter jejuni: molecular biology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology 5.9 (2007): 665-679.

6. Pope, Janet E., et al. Campylobacter reactive arthritis: a systematic review. Seminars in arthritis and rheumatism. Vol. 37. No. 1. WB Saunders, 2007.

7.Linton, D., et al. "PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli direct from diarrheic samples." Journal of Clinical Microbiology 35.10 (1997): 2568-2572.

8. Fernández, Heriberto, and Verónica Pisón. Isolation of thermotolerant species of Campylobacter from commercial chicken livers. International journal of food microbiology 29.1 (1996): 75-80.

9. Stern, N. J., and J. E. Line. Comparison of three methods for recovery of Campylobacter spp. from broiler carcasses. Journal of food protection 55.9 (1992): 663-666.

10. M.H. Shirazi et al, Drug resistance among campylobacter jejuni strain isolated from children with diarrhea in Tehran. Journal of Babol University of Medical Sciences; 15(1); Jan (2013): 79-83.

11. Steve R and Helen J. Skaletsky. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ (2000): 365-386

12. Kuroki, Shigekazu, et al. Campylobacter jejuni strains from patients with guillain□barré syndrome belong mostly to penner serogrpup 19 and contain β□N□acetylglucosamine residues. Annals of neurology 33.3 (1993): 243-247.

13.Hannu T, et al. Reactive arthritis following an outbreak of Campylobacter jejuni infection. The Journal of rheumatology 31.3 (2004): 528-530.

14.Steele M, et al. Enzymatic activity of Campylobacter jejuni hippurate hydrolase. Protein Engineering Design and Selection 19.1 (2006): 17-25.

15. Steele M, et al. Monoclonal antibodies specific for hippurate hydrolase of Campylobacter jejuni. Journal of clinical microbiology 40.3 (2002): 1080-1082.

16. Afshar D, et al. Molecular Detection of Shigella by PCR. Journal of Infectious Diseases, No. 54 (1390): 27-31.

17. Miller, William G., et al. Identification of genomic differences between Campylobacter jejuni subsp. jejuni and C. jejuni subsp. doylei at the nap locus leads to the development of a C. jejuni sub speciation multiplex PCR method." BMC microbiology 7.1 (2007): 11.

18. Broman, Tina, et al. Isolation and Characterization of Campylobacter jejuni subsp. jejuni from Macaroni Penguins (Eudyptes chrysolophus) in the Subantarctic Region." Applied and Environmental Microbiology 66.1 (2000): 449-452.