مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره۱۲، اسفند۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۱۹)

همسانه سازی و توالی یابی ژن‌های ویرولانس *ompA* و *smpA* اسینتوباکتر بامانی

حسین انصاری[۱،۲]، عباس دوستی[۳*]، محمد کارگر[۴]، مهدی بیژن زاده[۵]، مجتبی جعفری نیا[۲]

[۱]گروه ژنتیک مولکولی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران، [۲]گروه ژنتیک مولکولی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران، [۳]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران، [۴]گروه میکروبیولوژی، واحد جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، جهرم، ایران، [۵]گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۷/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۷

چکیده

زمینه و هدف: اسینتوباکتر بامانی یک پاتوژن نوظهور و مهم در بروز عفونت‌های مختلف از قبیل؛ عفونت دستگاه ادراری، بیمارستانی، مننژیت و دستگاه تنفسی می‌باشد. هدف از این مطالعه همسانه سازی و توالی یابی ژن‌های ویرولانس ompA و smpA اسینتوباکتر بامانی بیماریزا می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه نیمه تجربی، سویه بیماریزای اسینتوباکتر بامانی بر روی محیط‌های بلاد آگار و مک کانکی آگار کشت داده شد. تشخیص و تأیید اسینتوباکتر بامانی به روش‌های میکروسکوپی، کشت میکروبی و بیوشیمیایی انجام شد. دو ژن *ompA* و *smpA* با تکنیک PCR تکثیر و درون وکتور پلاسمیدی pTZ57R/T کلون شدند. صحت سازواره نوترکیب به دو روش PCR و هضم آنزیمی دوگانه انجام شد. دو ژن *ompA* و *smpA* کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T توالی یابی شدند. سپس ژن‌های *ompA* و *smpA* درون وکتور پروکاریوتی ساب کلون گردیده و بیان آنها در باکتری *اشرشیا کلی* به روش SDS-PAGE بررسی شد.

یافته‌ها: سویه بیماریزای اسینتوباکتر بامانی با روش های بیوشیمیایی و میکروبیولوژی تایید شد. از الکتروفورز محصولات PCR دو باند ۱۱۵۰ و ۴۱۱ جفت بازی به دست آمد که به ترتیب مربوط به ژن‌های *ompA* و *smpA* بود. نتایج انجام PCR و هضم آنزیمی دوگانه روی پلاسمیدهای نوترکیب، درستی تشکیل pTZ57R/T-ompA و pTZ57R/T-smpA را نشان داد. نتایج تعیین توالی، صحت کلون سازی را مشخص نمود.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که پلاسمیدpTZ57R/T برای کلون سازی قطعات بزرگDNA مناسب می‌باشد و با توجه به حفاظت شدگی بالای دو ژن *ompA* و *smpA* برای ساخت واکسن می‌توان از آنها استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اسینتوباکتر بامانی، همسانه سازی، *ompA*، *smpA*، تعیین توالی، pTZ57R/T

*نویسنده مسئول: **عباس دوستی**، شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی
Email: Abbasdoosti@yahoo.com

مقدمه

اسینتوباکتربامانی(*Acintobacter baumannii*) با شکل ظاهری کوکسی یا کوکوباسیل و گرم منفی است که قادر به تخمیر قندها نیست و همچنین نیازمندی‌های غذایی کمی دارد. این باکتری توانایی رشد در شرایط نامساعد، سطوح خشک و مرطوب را دارد و در این محیط‌ها به مدت طولانی زنده می‌ماند(۳ـ۱). اسینتوباکتر جزء باکتری‌های فرصت طلب محسوب می‌گردد و به ندرت عامل عفونت‌های سخت در افراد دارای ایمنی طبیعی می‌باشد، اما برای بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی به خصوص بیمارانی که در بخش‌های مراقبت‌های ویژه بیمارستان بستری هستند، یک تهدید جدی به شمار می‌آید(۵ـ۲). *اسینتوباکتربامانی* عامل طیف وسیعی از عفونت‌ها به ویژه عفونت‌های بیمارستانی، عفونت دستگاه ادراری، مننژیت، باکتریمی، عفونت زخم جراحی و سوختگی، عفونت پوست و بافت نرم و همچنین عفونت‌های دستگاه تنفس می‌باشد(۷ و۶).

این باکتری توانایی تشکیل بیوفیلم را دارد، بیوفیلم سبب مقاومت باکتری در برابر عوامل ضدعفونی کننده و شرایط نامناسب محیطی می‌شود و به باکتری‌های درون بیوفیلم این فرصت را می‌دهد که ژن‌های کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی را بین یکدیگر منتقل کنند(۸ و ۳، ۱). در مقایسه با سایر پاتوژن‌های گرم منفی، فاکتورهای ویرولانس شناسایی شده *اسینتوباکتر بامانی* بسیار کم است. دو پروتئین مهم در تشکیل بیوفیلم که در بیماری‌زایی این باکتری نیز نقش مهمی دارند عبارتند از: پروتئین‌های غشای خارجی (Outer membrane protein) و لیپوپروتئین غشاء خارجی باکتری‌ها می‌باشند(۸ و ۵، ۴). یکی از فاکتورهای بیماری‌زایی با ویژگی مناسب برای *اسینتوباکتر بامانی* تا به امروز پروتئین‌های غشای خارجی، به ویژهOmpA می‌باشد که توانایی القای آپوپتوز در سلول‌های اپی تلیال حنجره را دارد. OmpA یک پروتئین سه قسمتی، 38kD وزن دارد و نقش کلیدی در تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح زنده و غیر زنده، توسعه چسبندگی سلول ـ سلول و سلول ـ سطح را دارد(۸ و۳). پروتئین SmpA(small membrane protein A) جزء لیپوپروتئین‌های کوچک غشایی می‌باشد که در شکل‌گیری غشای خارجی باکتری و کمپلکس YaeT نقش دارد. این پروتئین در بین باکتری‌های گرم منفی بسیار حفاظت شده است به طوری که تنها دارای چند باز اشتباه(Mismatch) در ناحیه غیرضروری پروموتر می‌باشد. باکتری‌هایی که در ژن سنتز کننده پروتئین SmpA نقص دارند، حساسیت بالایی به دترجنت‌ها و آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل کلرامفنیکل، جنتامایسین، پلی‌میکسین B و آب اکسیژنه(H_2O_2) دارند(۸ و ۶، ۴، ۳). *اسینتوباکتر بامانی* دارای آنزیم‌های اگزاسیلیناز هیدرولیز کننده کاربا‌پنم‌ها می‌شود که باعث مقاومت باکتری به کاربا‌پنم‌ها و پنی‌سیلین‌ها می‌گردد(۹ و۱). از دیگر عوامل دخیل در مقاومت این سویه‌های باکتری مقاوم به دارو، پورین‌ها، تغییر پروتئین‌های متصل شونده به

پنی‌سیلین، آنزیم‌های تغییر دهنده آمینوگلیکوزیدها و هم‌چنین مقاومت به کینولون‌ها در نتیجه کسب پلاسمید و مکانیسم پمپ خارج کننده(Effluent Pump) می‌باشد(۱۵ـ۹). *اسینتوباکتر بامانی* به اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهد و شکست درمانی این سویه‌های مقاوم به دارو سبب افزایش هزینه‌های بستری و مرگ و میر مبتلایان می‌گردد(۱۶ـ۱۳). از این رو ضرورت دست یابی به یک روش جایگزین درمانی یا پیشگیری (مانند واکسیناسیون) مطرح می‌شود. از آنجا که دو ژن *ompA* و *smpA* اسینتوباکتر بومانی از پتانسیل لازم برای ایجاد پاسخ ایمنی در میزبان برخوردارند، لذا هدف از این مطالعه، همسانه‌سازی ژن‌های *ompA* و *smpA* اسینتوباکتر بامانی در وکتور مناسب و تعیین توالی آنها می باشد. از ژن‌های کلون شده در این تحقیق می توان به عنوان کاندیدای واکسن ژنی در مطالعات آینده بهره برد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به صورت تجربی ـ آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۴ در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انجام شد.

سویه های بیماریزای اسینتوباکتر بامانی جمع آوری شدند و شناسایی باکتری‌ها بر اساس کشت بر روی محیط‌های اختصاصی، افتراقی و هم‌چنین آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل مک کانکی آگار، بایل اسکولین، SIM، رشد در دمای ۴۴ درجه سانتی‌گراد، اکسیداز، کاتالاز، همولیز، TSI، مالئونات، رنگ‌آمیزی گرم، آرژنین هیدرولیز، اورنیتین دکربوکسیلاز، سیترات و هیدرولیز ژلاتین انجام شد.

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت کیاژن، ایران) طبق پروتکل شرکت سازنده صورت گرفت. با استفاده از دستگاه نانو دراپ (ND-1000 PeqLab) غلظت DNA استخراج شده اندازه‌گیری شد. DNA استخراج شده تا مرحله بعدی کار در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور طراحی پرایمرهای رفت و برگشت ابتدا توالی DNA ژن کد کننده OmpA و SmpA از اطلاعات بانک ژنی اینترنتی http/www.ncbi.com به دست آمد. با استفاده از این اطلاعات و نرم افزار Gene runner پرایمرها طراحی و سپس در ناحیه '5 پرایمرها جایگاه برش برای آنزیم‌های برش دهنده قرار داده شد (جدول ۱)، و در نهایت جهت صحت در شناسایی ژن-های مورد نظر، بلاست شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت که شامل ترکیب‌های زیر بود؛ ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۱ میکرولیتر Mgcl2 (۵۰ میلی مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰میلی‌مولار)، ۱ میکرولیتر از مخلوط هر یک از آنزیم های DNA پلی‌مرازی Pfu و Taq (۱ واحد)، ۳ میکرولیتر DNA استخراج شده (۱۰۰ نانوگرم)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول در میکرولیتر) و ۱۵ میکرولیتر آب مقطر استریل مواد فوق درون میکروتیوپ ۰/۲ میلی لیتری ریخته شده و پس از

همگن‌سازی در داخل دستگاه ترموسایکر (Mastercycler Gradient, Eppendrof, Germany) قرار داده شدند. ژن‌های *ompA* و *smpA* طبق برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، دناتوراسیون ثانویه به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سا نتی‌گراد، اتصال(Annealing) به مدت یک دقیقه در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد، سنتز(Extension) به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی(Final Extension) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد تکثیر شدند. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و باندهای مربوط به *ompA* و *smpA* از ژل بریده شدند. باندهای مورد نظر به وسیله کیت تخلیص DNA از ژل(Bioneer Co., Korea) طبق پروتکل شرکت سازنده تخلیص شدند.

در این مطالعه به منظور کلونینگ ژن‌های *ompA* و *smpA* از کیت T/A کلونینگ(Thermo Scientific, Lithuania) استفاده شد و آزمایش‌ها بر اساس روش کار کیت انجام شد. به این صورت که واکنش اتصال با استفاده از ۳ میکرولیتر بافر ۱۰X لیگاسیون، ۲ میکرولیتر آنزیم T4 لیگاز، وکتور (PTZ57R/T) ۳ میکرولیتر، محصول PCR(ژن‌های تخلیص شده از ژل) ۱۵ میکرولیتر و ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل، در حجم ۳۰ میکرولیتر انجام شد. مواد فوق در یک میکروتیوب ۰/۵ میکرولیتری ریخته شده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق(۲۵درجه سانتی‌گراد) و سپس به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد.

انتقال پلاسمید به داخل باکتری به کمک روش شیمیایی و شوک حرارتی که به طور خلاصه بیان می‌شود، صورت گرفت. یک کلنی از باکتری *E. coli* سویه نوابلو(NovaBlue) درون محیط LB مایع کشت داده شد و به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس رسوب‌گیری با سانتریفیوژ (به مدت ۳ دقیقه به صورت ۹۰۰۰ دور در دقیقه) انجام گرفت و در ادامه باکتری‌ها در سه مرحله ۳۰ دقیقه‌ای به کمک کلریدکلسیم ۰/۱ مولار سرد استریل، مستعد و در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش لیگاسیون به ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های مستعد اضافه شد. مخلوط به آرامی و بدون ورتکس به مدت ۳۰ دقیقه درون آب سرد قرار داده شد. سپس به سلول‌های مستعد در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد. سپس این سوسپانسیون سلولی به مدت ۵ دقیقه در آب یخ (۴ درجه سانتی گراد) قرار داده شد. یک میلی‌لیتر محیط LB مایع بدون آنتی‌بیوتیک به سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شده اضافه شد و باکتری ها به مدت یک ساعت درون انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. در نهایت باکتری‌های ترانسفورم شده روی محیط LB آگار دار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر)، X-gal و IPTG کشت داده شدند. کلنی‌هایی که دارای پلاسمید PTZ57R/T فاقد قطعه درج شونده، توانایی تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز را دارند، بنابراین ترکیب X-gal را تجزیه کرده و تولید ایندولیل می‌نمایند و کلنی‌های شکل یافته دارای رنگ آبی خواهند بود. اما باکتری‌های دارای پلاسمید نوترکیب(پلاسمید

PTZ57R/T دارای قطعه درج شونده) توانایی تولید آنزیم بتا گالاکتوزیداز و تجزیه X-gal را ندارند، بنابراین کلنی سفید تشکیل می‌دهند. از کلنی‌های رشدیافته سفید رنگ بروی محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ماتریکس تهیه شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند.

جهت ردیابی دقیق ژن‌های *ompA* و *smpA* از خانه‌های ماتریکس تهیه شده به روش جوشاندن(Boiling) استخراج پلاسمید انجام شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از مواد زیر انجام شد. پلاسمید استخراج شده ۱ میکرولیتر، از هر یک از آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت ۱ میکرولیتر، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR10X buffer)، کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار ۱ میکرولیتر، مخلوط dNTPs ۱۰ میلی‌مولار ۰/۵ میکرولیتر، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تک پلیمراز با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر، حجم نهایی مخلوط با آب مقطر استریل ۲۵ میکرولیتر شد. مخلوط فوق با برنامه دمایی ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۲ سیکل (۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۱دقیقه در ۶۳ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و یک سیکل انتهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموسایکلر اپندورف قرار داده شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بروی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با استفاده از دستگاه ژل داک(Uvitec, UK) عکس برداری انجام شد.

جهت تأیید کلونینگ ژن‌های *ompA* و *smpA* به روش هضم آنزیمی دوگانه از خانه‌های ماتریکس مثبت شده به روش کلنی PCR، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت استخراج پلاسمید(Bioneer Co., Korea) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. هضم آنزیمی دوگانه بر اساس سایت‌های برش آنزیم‌های موجود در دو طرف '5 و '3 قطعه کلون شده و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر صورت پذیرفت. به این صورت که ۲ میکروگرم از پلاسمید استخراج شده، ۵ واحد از هر یک از آنزیم های برش دهنده و ۲ میکرولیتر از بافر 10X مخصوص هر آنزیم در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه شد.

محلول هضم آنزیمی‌به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم‌خانه‌گذاری شد و سپس محصولات بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند.

پلاسمیدهای استخراج شده pTZ57R/T حاوی ژن‌های *ompA* و *smpA* به همراه آغازگرهای اختصاصی جهت توالی یابی به شرکت Gene Ray آلمان فرستاده شدند و نتایج حاصل از توالی یابی، جهت تأیید و صحت آنها در بانک ژنی NCBI بلاست شدند.

ژن‌های *ompA* و *smpA* *آسینتوباکتر بامانی* با استفاده از آنزیم‌های Xba1/BamH1 و Kpn1/Bgl2 از وکتور pTZ57R/T جدا و درون وکتور پروکاریوتی pET32 کلون شدند. ترانسفورم سازواره‌های ساخته شده به روش شوک حرارتی و کلریدکلسیم انجام شد. سپس بیان پروتئین‌های نوترکیب OmpA و SmpA در باکتری *E. coli* به روش SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) انجام شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده به همراه اطلاعات آنها

نام ژن	توالی پرایمر	آنزیم برش دهنده	اندازه محصول
ompA-F	5- AGGTCTAGAATGAAATTGAGTCGTATTGC-3	XbaI	1150bp
ompA-R	5- CGTGGATCCTTTTTACTGTTCAAGAACTC-3	BamHI	
smpA-F	5- ATAGGTACCATGCAAAAACTCGTGCTGAC-3	KpnI	411bp
smpA-R	5- CGGAGATCTTTATTAGTGGTGGGGCAGTTA-3	BglII	

یافته‌ها

نتایج حاصل از رشد سویه های بیماریزای اسینتوباکتر بامانی بر روی محیط‌های اختصاصی و افتراقی، نشان دهنده ی ویژگی های صحیح بیوشیمیایی و میکروبی در خصوص این باکتری بود.

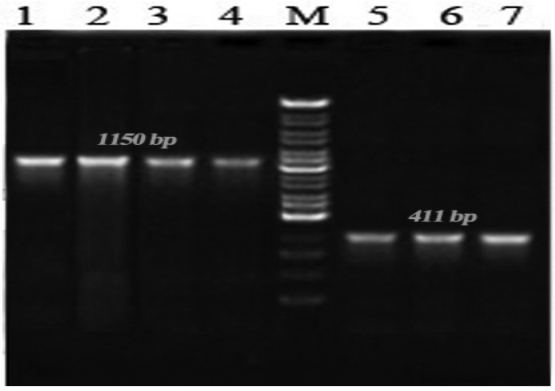
نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی روی DNA ژنومی اسینتوباکتر بامانی، سبب تکثیر دو باند ۱۱۵۰و ۴۱۱جفت بازی شد که به ترتیب مربوط به ژن‌های *ompA* و *smpA* می‌باشد(شکل۱).

پس از انجام کلون سازی T/A، حدود ۹۰ درصد کلنی‌های رشد یافته دارای رنگ سفید و نشان دهنده این بود که قطعات تکثیر یافته ژن‌های *ompA* و *smpA* در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده‌اند و باکتری های *E. coli* پلاسمیدهای نوترکیب را دریافت نموده اند.

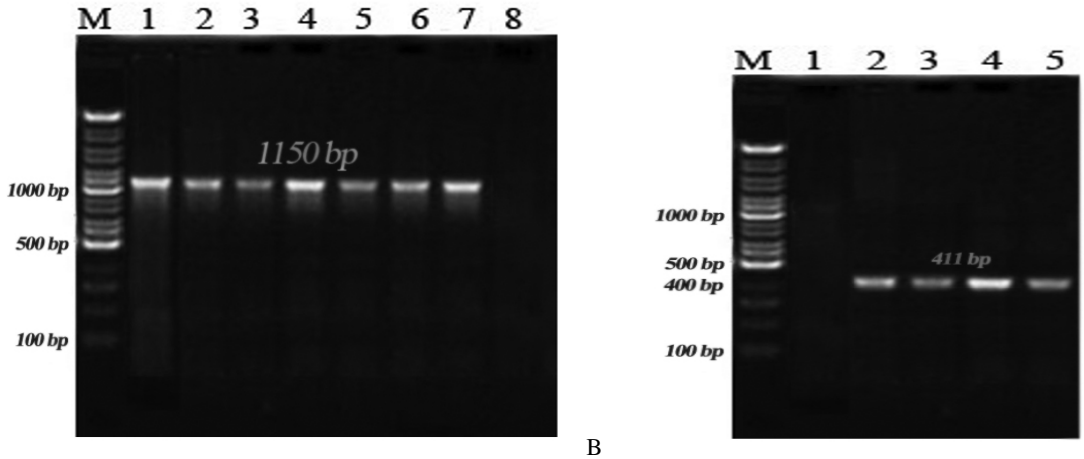
نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بروی پلاسمیدهای pTZ57R/T حاوی ژن‌های *ompA* و *smpA* جهت تأیید کلونینگ نشان داد که همه خانه‌های ماتریکس، دارای ژن‌های *ompA* و *smpA* کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T هستند و پلاسمید های نوترکیب pTZ57R/T-ompA و pTZ57R/T-smpA تشکیل شده‌اند(شکل ۲).

نتایج هضم آنزیمی دوگانه پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T-ompA و pTZ57R/T-smpA به ترتیب با آنزیم‌های BamH1/Xba1 و Bgl2/Kpn1 به منظور تأیید صحت کلونینگ، دو باند نشان داد. باندهای ۱۱۵۰و ۴۱۱جفت‌بازی که مربوط به ژن‌های *ompA* و *smpA* و دیگری باند مربوط به وکتور pTZ57R/T دارای اندازه ۲۸۸۶ جفت بازی می‌باشد(شکل ۳).

نتایج حاصل از SDS-PAGE نشان داد که این دو پروتئین rOmpA و rSmpA با بازده بالا در باکتری اشیرشیاکلی تولید می‌شود. هم‌چنین توالی یابی ژن‌های *ompA* و *smpA* کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T که از سویه بیماری‌زای اسینتوباکتر بامانی جداسازی شده بود در مقایسه با توالی‌های موجود از این ژن ها در بانک ژنی پایگاه NCBI شباهت داشت و نشان دهنده عدم وجود جهش و تغییر در توالی دو ژن *ompA* و *smpA* در حین مراحل تکثیر و کلون سازی می باشد. تصویر بخشی از نتایج تعیین توالی ژن *ompA* اسینتوباکتر بامانی در شکل ۴ مشاهده می شود.

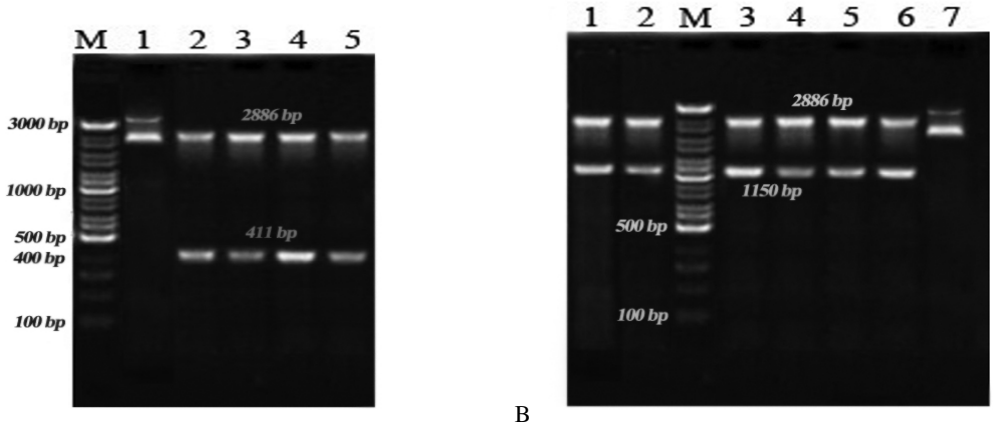


شکل ۱: انجام PCR روی ژنوم باکتری اسینتوباکتر بومانی برای ژن‌های *ompA* و *smpA*
ردیف‌های شماره ۱ تا ۴ دارای باند ۱۱۵۰ جفت بازی بوده و نشان دهنده تکثیر ژن *ompA* می باشند. ردیف‌های ۵ تا ۷ دارای باند ۴۱۱ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن *smpA* است. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاز است.



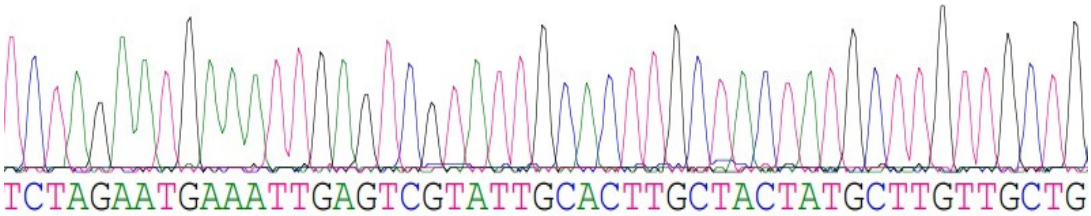
A B

شکل ۲: انجام PCR برای تایید حضور ژن های ژن‌های *ompA* و *smpA* در پلاسمیدهای نوترکیب pTZ57R/T-ompA و pTZ57R/T-smpA.
شکل‌های A و B، به ترتیب نشان دهنده باند ۱۱۵۰ و ۴۱۱ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن‌های *ompA* و *smpA* است. مارکر مورد استفاده در هر دو تصویر، مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز است. شماره ۸ در شکل A و شماره ۱ در شکل B، کنترل منفی (بدون DNA) هستند.



A B

شکل ۳: هضم آنزیمی وکتورهای نوترکیب pTZ57R/T-ompA و pTZ57R/T-smpA برای تایید صحت کلونینگ. شکل A) نشان دهند هضم آنزیمی وکتور pTZ57R/T-smpA با دو آنزیم KpnI/BglII بوده و دو باند ۲۸۸۶ و ۴۱۱ جفت بازی به ترتیب مربوط به وکتور و ژن در شماره‌های ۲ تا ۵ دیده می شود. شکل B) مربوط به هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pTZ57R/T-*ompA* با آنزیم‌های XbaI/BamHI است. باندهای با اندازه ۲۸۸۶ و ۱۱۵۰ جفت بازی به ترتیب منطبق با وکتور و ژن مربوطه در شماره‌های ۱ تا ۶ دیده می شود. مارکر مورد استفاده در هر دو تصویر، مارکر ۱۰۰ جفت بازی فرمنتاز است. شماره ۱ در شکل A و شماره ۷ در شکل B، نشان دهنده پلاسمیدهای کامل (بریده نشده) است.



شکل ۴: نتیجه بخشی از دندروگرام تعیین توالی ژن *ompA*

بحث

در این تحقیق، ژن‌های مؤثر در بیماری‌زایی و تشکیل بیوفیلم اسینتوباکتر بامانی و کاندیدای واکسن، جداسازی و کلون شدند(۱۲ و۱۱). در مطالعه حاضر از پلاسمید pTZ57R/T برای کلون کردن ژن‌های *ompA* و *smpA* جهت تهیه واکسن ژنی استفاده شد، پلاسمید pTZ57R/T در سال ۱۹۹۲ میلادی به وسیله کلوز و همکاران جهت کلونینگ با بازده بالا معرفی شد(۱۷). در مطالعه دیگری جعفری و همکاران بر روی پروتئین میکرونم ۳ (Mic3) توکسوپلاسما گوندی انجام دادند. از پلاسمید pTZ57R/T به عنوان وکتور T/A کلونینگ استفاده کرد که میزان کارآمدی بالایی برای کلونینگ ژن Mic3 را نشان داد(۱۸). چویی و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که پروتئین *ompA* (AbOmpA) از طریق هدف قرار دادن میتوکندری در سلول‌های اپی تلیال باعث القائ آپوپتوزیس می‌گردد(۴). الوریدو همکاران در مطالعه‌ای به بررسی میزان ایمنی‌زایی *ompA* جدا شده از اسینتوباکتر بومانی پرداختند و به این نتیجه رسیدند که پروتئین *ompA* توانایی تحریک سیستم ایمنی سلولار و هومورال را دارد(۱۹). در مطالعه سینگ و همکاران، پروتئین *ompA* یا کمپلکس *BamA* را به عنوان کاندید مناسب جهت تهیه واکسن پپتیدی برعلیه اسینتوباکتر بومانی معرفی کردند، زیرا توانایی تحریک هر دو سیستم ایمنی سلولار و هومورال را دارند(۲). الزبیدی و همکاران به بررسی ایمنی زایی پپتید *ompA* متصل به نانوپارتیکل کیتوزان(Chitosan) پرداختند و مشاهده کردند که تیتر سایتوکین‌هایی مثل IL6، IL2 و اینترفرون گاما در اثر تزریق این پپتید به موش افزایش می‌یابد(۲۰). نتایج کلونینگ مطالعه حاضر با مطالعه‌های مذکور در بخش‌های اولیه کلونینگ(T/A کلونینگ)ژن‌های *ompA* و *smpA* هم‌خوانی دارند.

نتیجه توالی یابی ژن‌های *ompA* و *smpA* جدا شده از ایزوله‌های کلنیکی *اسینتوباکتر بومانی* دارای تشابه به ترتیب ۹۰ و ۹۵ درصدی با توالی موجود در بانک ژنی NCBI داشت. نتایج دلالت بر حفاظت شدگی این دو ژن در میان سویه‌های *اسینتوباکتر بامانی* می‌باشد. موریل و همکاران پروتئین‌های کاندید برای ساخت واکسن نوترکیب برعلیه *اسینتوباکتر بامانی* را به سه گروه تقسیم نمودند. گروه اول شامل؛ چهار پروتئین بسیار رایج و حفاظت شده در میان آنها بود

کـه دو پـروتئینOmpA و SmpA در ایـن گـروه قـرار داشتند(۱۱) که با مطالعـه حاضـر هـم‌خـوانی دارد. در مقالـه دیگـری چیانـگ مینـگ و همکـاران بـه بررسـی پـروتئین‌هـای حفاظـت شـده در میـان گونـه‌هـای *اسـینتوباکتر بامـانی* جهـت تهیـه واکسـن برعلیـه ایـن باکتری پرداختند. ۷۷ پروتئین بسیار حفاظـت شـده را به عنوان کاندید معرفی شد که پروتئینOmpA جزء این پروتئین‌ها بود(۱۲). با نتایج مطالعـه حاضـر در مـورد پروتئینOmpA هم‌خوانی دارد. ژن *ompA* به دلیل این که توانایی اتصال به سلول‌های اپی تلیال میزبـان و القـاء آپوپتوز را دارد. هم‌چنین جزء فاکتورهای مهم بیماری زایی این باکتری می‌باشـد ودر تشـکیل بیـوفیلم نقـش مهمی بر عهده دارد(۲۰ و ۱۹، ۱۱، ۱۰، ۸، ۴). از این رو جهت طراحی و ساخت واکسن امید محققین به این ژن می‌باشد. زیرا عقیده بر این است کـه در مراحـل اولیـه تهـاجم بـاکتری، میزبـان را بـه وسـیله فاکتورهـای بیمـاری‌زا ماننـد *ompA* و*smpA* پاسـخ ایمنـی را القـا و میزبان را برعلیه باکتری پاتوژن ایمن کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان مـی‌دهـد کـه همسـانه‌سـازی و ترانسفورماسـیون ژن‌هـای *smpA* و*ompA* در پلاسمیدpTZ57R/T بـا موفقیـت و کارآمـدی بالا انجام شده است. بنابراین پلاسمید pTZ57R/T و نیز بـاکتری اشرشـیاکلی سـویه نوابلـو بـه ترتیـب جهـت همسـانه‌سـازی و ترانسفورماسـیون ژن‌هـای *ompA* و *smpA* و سایر ژن‌ها مناسب می‌باشند. هم‌چنین به دلیـل حفاظت شدگی بالای این ژن‌هـا جهـت تهیـه و سـاخت واکسن‌های نوترکیب و ژنی می‌تـوان از آنهـا اسـتفاده کرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله مربوط به بخشـی از رسـاله دکتـری ژنتیک واحدعلوم تحقیقات فارس(مرودشت) می‌باشـد. نویسـندگان ایـن مقالـه از کارکنـان مرکـز تحقیقـات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی‌شـهرکرد بـه دلیـل همکاری صادقانه کمال تقدیر و تشکر را دارند.

REFERENCES

1.Ali RA. Genetic study to bacteria Acinetobacter baumannii - Lactamase producer. J Al-Nahrain Univ 2010; 13(4):159–65.
2.Singh R, Garg N, Capalash N, Kumar R, Kumar M. In silico Analysis of Acinetobacter baumannii Outer Membrane Protein BamA as a Potential Immunogen. Int J Pure Appl Sci Technol 2014; 21(2): 32–9.
3.Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in Acinetobacter baumannii. New Microbiol 2014; 37: 119–27.
4.Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS, Kim SA, et al. Acinetobacter baumannii outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. Microbiology 2008; 10: 309–19.
5.Taylor P, Howard A, Donoghue MO, Feeney A, Sleator RD, Howard A, et al. Acinetobacter baumannii An emerging opportunistic pathogen. Virulence 2012; 3(3): 243-350.
6.Eijkelkamp BA, Stroeher UH, Hassan KA, Paulsen IT, Brown MH. Comparative analysis of surface-exposed virulence factors of Acinetobacter baumannii. BMC Genomics 2014; 15(1): 1–12.
7.Snitkin ES, Zelazny AM, Montero CI, Stock F, Mijares L, Sequence NC. Genome-wide recombination drives diversi fi cation of epidemic strains of Acinetobacter baumannii. Proc Natl Acad Sci 2011; 108(33): 13758–63.
8.Mcconnell MJ, Actis L. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. FEMS Microbiol Rev 2013; 37 (2): 130-155.
9.Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, Quereda C, Martínez-beltrán J, Bou N, et al. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *a. baumannii* is not due solely to the presence of b-lactamases. J Clin Microbiol 2000; 38(9): 3299-305.
10.Fattahian Y, Rasooli I, Mousavi Gargari SL, Rahbar MR, Darvish Alipour Astaneh S, Amani J. Protection against acinetobacter baumannii infection via its functional deprivation of biofilm associated protein (Bap). Microb Pathog 2011; 51(6): 402–6.
11.Moriel DG, Beatson SA, Wurpel DJ, Lipman J, Nimmo GR, Paterson DL, et al. Identification of Novel Vaccine Candidates against Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii. PLoS One 2013; 8(10): 77631.
12.Ming-Hsien C, Wang-Chou S, Shu-Pei L, Chen YZ, YanLo AF, Hung HJ, et al. Identification of novel vaccine candidates against Acinetobacter baumannii using reverse vaccinology. Human Vaccines & Immunotherapeutics 2015, 11(4), 1065-73.
13. Bahador Goudarzi H, Douraghi M, Ghalavand Z, Goudarzi M. Assessment of antibiotic resistance pattern in Acinetobacter bumannii carrying bla oxA type genes isolated from hospitalized patients. Novelty in Biomedicine.2013; 1(2):54–61.
14.Maleki A, Jalilvand Y, Mirzaie Z, Ghafourian S, Kazemian H, Sadeghifard N, et al. Molecular analysis Acinetobacter baumannii isolted Tehran hospitals by RCP-CIRE Method. Mod Med Lab. 2016; 1(1): 12 – 16.
15.Ahmadi Kh, Mardaneh J, Saadat S. Determination antimicrobial resistance profile of Acinetobacter strains isolated from hospitalized patients in Different Part of Taleghani Hospital (Ahvaz, Iran). ISMJ 2014; 17(4): 620-8.
16.Rezaee D, Zarrini G, Ahangarzadeh Rezaee M. Antibiotic susceptibility and molecular typing by rep-pcr among acinetobacter baumannii isolates. Journal of Ardabil University of Medical Sciences 2014; 14(1): 28-36.
17 Kaluz S, Kölble K, Reid KB. Directional cloning of PCR products using exonuclease III, Nucleic Acids Res 1992; 20(16): 4369–4370.
18.Jafari-Modrek M, Chaffarifar F, Shirazi Z, Dalimi-Asl A. Cloning and sequencing the plasmid encoding Toxoplasma gondii Microneme 3 protein. Feyz 2011; 15(3): 200-6.
19.Al-warid RJM, Al-thahab AAL. Cellular immune response to outer membrane proteins isolated. International Journal of Research in Applied Natural and Social Sciences 2014; 2(1): 91–6.
20.Asraa N. Alzubaidi A, Ziad M. Alkozai F. Immunogenic properties of outer membrane protein of Acinetobacter baumannii that loaded on chitosan nanoparticles. Am J Biomed 2015; 3(2): 59–74.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Cloning and Sequencing of the *ompA* and *smpA* Virulence Genes of *Acentobacter baumannii* Isolated in Clinical Samples

Ansari H[1], Kargar M[2], Bijanzadeh M[3], Jafarinya M[1], Doosti A[4*]

[1]Department of Genetic, Marvdasht branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran, [2]Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran, [3]Department of Medical Genetic, Jundishapoor University of Medical Sciences Ahvaz, Ahvaz, Iran, [4]Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 14 Oct 2016 Accepted: 25 Feb 2017

Abstract

Background and aim: *Acinetobacter baumannii* is one of the emerging and important pathogens in various infections such as urinary tract infection, hospitals, meningitis and respiratory tract. The aim of this research is cloning and sequencing of *ompA* and *smpA* virulence genes of *A. baumannii*.

Methods: In this experimental study, the pathogenic *A. baumannii* was cultured on blood agar and macconkey agar mediums. Recognition of *A. baumannii* with microscopic, microbiologic and biochemical tests were performed. *ompA* and *smpA* genes were amplified by PCR and then cloned into the pTZ57R/T vector. The accuracy of the recombinant construct was carried out with PCR and enzymatic double digestion and then the both of *ompA* and *smpA* genes were sequenced. The evaluation of bacterial expression of these genes was performed with SDS-PSGE method in *E. coli.*

Result: The pathogenic *A. baumannii* was confirmed in biochemical and microbiological methods. After electrophoresis of the PCR products, the 1150 and 411 bp fragments of *ompA* and *smpA* genes were obtained, respectively. The results of PCR and double digestions on recombinant plasmids showed that the pTZ57R/T-*ompA* and pTZ57R/T-*smpA* were generated. The sequencing results confirmed the accuracy of the gene cloning.

Conclusion: The results showed that the pTZ57R/T is a suitable vector for the cloning of large fragment of PCR products and *ompA* and *smpA* are two highly conserved genes that appropriate for use as DNA vaccine.

Keywords: *Acinetobacter baumannii,* Cloning*, ompA, smpA,* Sequencing

[*]**Corresponding author: Doosti A,** Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
Email: Abbasdoosti@yahoo.com

Please cite this article as follows:
Ansari H, Kargar M, Bizhanzadeh M, Jafarinya M, Doosti A. Cloning and Sequencing of the ompA and smpA Virulence Genes of Acentobacter baumannii Isolated in Clinical Samples. Armaghane-danesh 2017; 21 (12): 1207-1217.