Archive of SID

مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان ۱۳۸۹، دوره دوم، شماره پنجم، صفحه ۴۸-۴۱

بررسی فراوانی پلاسمید pXO در باسیلوس های غیر بیماریزا با مشاهده باند پلاسمیدی و باند پروتئینی در الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید

سید حسین شاهچراغی[۱]،دکتر جمیله نوروزی[۲]، دکتر محمد حسن شاه حسینی[۳]، دکتر غلامرضا جوادی[۱]، حجت الله مرادی[۱]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم پایه ،گروه زیست شناسی.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد شهر قدس ، گروه میکروبیولوژی.

نویسنده مسؤول: سید حسین شاهچراغی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه میکروبیولوژی shahcheraghih@gmail.com

دریافت: ۸۹/۱/۱۱ پذیرش: ۸۹/۴/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: پلاسمید pXO1 در *Bacillus anthracis* مسئول رمز کردن ژن‌های تولید توکسین است و پلاسمید pXO2، مسئول رمز کردن ژن‌های سنتز کپسول می‌باشد. پلاسمید مسئول سنتز توکسین، 189kb و پلاسمید مسئول سنتز کپسول، 95kb اندازه دارند. هدف از این مطالعه، بررسی حضور ژن pxo در *Bacillus cereus*، *Bacillus subtilis* و *Bacillus thuringiensis* بوده است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، ٦٥ نمونه خاک از سراسر کشور جمع آوری شد و سپس تست های استاندارد بیوشیمیایی انجام شد. با استفاده از روش فنل و کلروفرم، جداسازی پلاسمید pXO1 انجام و وجود آن با استفاده از الکتروفورز ژل اگاروز تأیید گردید. سپس جداسازی پروتئین‌ها از ارگانیسم‌های ایزوله شده انجام شد و برای مشاهده باندهای پروتئینی، از تست SDS-PAGE استفاده شد.

یافته‌ها: از ٦٥ نمونه خاک جمع آوری شده، ۳۱ باسیلوس جدا شدند که ۱۹ مورد آنها *Bacillus cereus*، ۱۲ مورد *Bacillus subtilis* بودند و ۷ باسیلوس نیز اهدایی و شامل ۲ *Bacillus cereus* و ۲ *Bacillus subtilis* و ۳ *Bacillus thuringiensis* بودند. در ۱۳ *Bacillus cereus* باند پلاسمیدی مربوط به پلاسمید pXO1 در الکتروفورز مشاهده شد. در SDS-PAGE نیز باندهای پروتئینی مربوط به پلاسمید pXO1 که مسئول رمز کردن توکسین در *Bacillus anthracis* است در همان ۱۳ *Bacillus cereus* یعنی ۳٤/۲ درصد از کل باکتری ها مشاهده گردید، ولی باند پروتئینی مربوط به پلاسمید pXO2 که مسئول رمز کردن کپسول در *Bacillus anthracis* است، در کل باسیلوس های مورد بررسی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد که انتقال پلاسمید pXO1 از *Bacillus anthracis* به *Bacillus cereus* در ایران انجام شده است ولی انتقال پلاسمید pXO2 به هیچ کدام از باسیلوس های مورد بررسی صورت نگرفته بود.

واژه‌های کلیدی: SDS-PAGE، باسیلوس، پلاسمید pXO1

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

باسیلوس‌ها باکتری‌های گرم مثبت هوازی اجباری هستند که به فراوانی در آب، خاک و هوا وجود دارند. باسیلوس آنتراسیس (*Bacillus anthracis*) عامل بیماری سیاه‌زخم است و در جنگ های بیولوژیک در ساخت سلاح کاربرد دارد. دارای دو پلاسمید از نوع pXO می باشد که یکی (pXO1) تولید توکسین را عهده دار است و دیگری (pXO2) حامل ژن کپسول است. اندازه پلاسمید pXO1 در *Bacillus anthracis*، 189kb و اندازه پلاسمید pXO2 آن 95kb می باشد. توکسین *Bacillus anthracis* پروتئین کمپلکسی است که از چند واحد آنتی ژنی شامل Protective antigen (PA)، Lethal factor (LF) و Edema factor (EF) تشکیل می شود. وزن مولکولی ۳ پروتئین فوق به ترتیب , 83kD 88/8kD , 82/7kD است (۱و۲).

باسیلوس تورنجینزیس (*Bacillus thuringiensis*) به عنوان عامل بیماری زای حشرات مطرح است. گزارش هایی در مورد فعالیت *B. thuringiensis* در برابر پشه هائی که ناقل برخی از بیماری ها مثل مالاریا و تب زرد می باشند، ارائه شده است. ذرات پروتئین کریستالی بزرگی در این باکتری وجود دارند که در اصل پروتوکسین هستند و اندازه ای حدود ۱۳۰ kDa تا ۱۴۰ kDa دارند و ۲۵ درصد وزن خشک فرآورده های اسپور را به خود اختصاص می دهند (۳).

باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) باکتری غیر بیماریزایی است که برای بررسی رشد و تمایز سلولی بسیار خوب و مناسب است. این باکتری به نام های *باسیلوس ناتو* (*Bacillus nato*) و *باسیلوس گلوبیجی* (*Bacillus globigi*) نیز شناخته شده است. اسپور این باکتری به فراوانی در خاک یافت می‌شود. بر روی محیط کشت اگار خوندار باعث بروز همولیز کامل بتا می شود. *Bacillus subtilis* در دماهای مزوفیل $20^{\circ}C$ تا $32^{\circ}C$ رشد می کند. برخی از گونه های این باسیلوس ترشح کننده آنتی بیوتیک هم هستند و در صنعت از این عمل آن بهره گیری می شود (۴و۵).

باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*) عامل مسمومیت غذایی می باشد و محتوی همولیزین ها (همولیزین I و همولیزین II و همولیزین BL و سرئولیزین AB)، فسفولیپاز C، عامل VPR (توکسین مسبب و عامل اسهال که توکسین نکروتیک هم نام دارد) و توکسین ایجاد کننده استفراغ است. این باکتری در غذاهای مختلف مثل برنج، ادویه، گوشت، تخم مرغ و محصولات لبنی بخصوص شیر حضور داشته و از داروهای موضعی و خوراکی نیز جدا شده است (۶).

طی یک بررسی، قطعه ای از پلاسمید pXO1 در *B. anthracis* ، *B. cereus* و *B. thuringiensis* بسیار مشابه بود. مشخص شد که یک ایزوله از *B. cereus* بنام DBT248، فاقد پلاسمید pXO1 می باشد. در این تحقیق، تعداد ۲۴ گونه *B. cereus* و *B. thuringiensis* از طریق واکنش زنجیر پلیمراز (PCR) مورد بررسی قرار گرفتند. از تعداد ۲۴ گونه بررسی شده، ۶ *B. thuringiensis* و ۱۲ *B. cereus* دارای قطعه ای شبیه قطعه موجود در پلاسمید pXO1 بودند (۷).

در مطالعه ای شناسایی ژن های توکسین *B. anthracis* در *B. cereus* مرتبط با آن که نوعی بیماری شبیه سیاه زخم می داد، انجام شد و پلاسمیدی که شباهت زیادی به پلاسمید مسئول رمز کردن توکسین باکتری در *B. anthracis* داشت، در *B. cereus* G9241 یافت شد. در این تحقیق همچنین ژن های مرتبط با تولید کپسول (پلاسمید pXO2) بررسی شد و شباهت بین این ژن ها با ژن های مسئول رمز کردن کپسول در *B.anthracis* به اثبات نرسید (۸).

در مطالعه ای دیگر ایزوله های مختلف *B.cereus* بررسی شدند که در میان پلاسمیدهای شناسایی شده، پلاسمیدهای شبیهpXO1 با اندازه ای حدود ۲۷۲kb وجود داشتند که نسبت به پلاسمید pXO1، بزرگتر بودند. همچنین مشخص گردید که پلاسمیدهای pPER272 و pCER270 بزرگترین پلاسمیدهای شبیه pXO1 بودند (۹).

با توجه به یافته های مطالعه های فوق تحقیق حاضر به منظور اثبات انتقال پلاسمید مسئول سنتز توکسین و نیز

www.SID.ir

Archive of SID

پلاسمید مسئول سنتز کپسول به ایزوله های *B. cereus*، *B. thuringiensis* و *B. subtilis* از *B. anthracis* با استفاده از مشاهده باند پلاسمیدی در الکتروفورز ژل اگاروز و مشاهده باند پروتئینی در تکنیک (SDS-PAGE) Sodium Dudsyl Sulfat- Polyacrilamid Gel Electrophoresis انجام گرفت.

روش بررسی

تعداد ۶۵ نمونه خاک از سطح و عمق سه سانتیمتری خاک مناطق مختلف ایران شامل: استان های خوزستان، کرمانشاه، یزد، خراسان رضوی، تهران، همدان، ایلام، فارس و سمنان جمع آوری شد. پس از الک نمودن خاک های جمع آوری شده، یک گرم از هر نمونه خاک صاف شده درون لوله در پیچدار استریل ریخته شد و در بن ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و پس از خنک شدن، از هر سوسپانسیون بر روی یک محیط نوترینت اگار کشت داده شد و در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. سپس رنگ آمیزی گرم و بعد از آن رنگ آمیزی اسپور انجام شد. در مرحله بعد تست های بیوشیمیایی شامل تست ووگس پروسکائر (VP)، تست لستیناز، تست سیترات، رشد در محیط حاوی ۶/۵ درصد نمک طعام، تست حساسیت به پنی‌سیلین، تست حرکت، تست همولیز، رشد در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد، تست هیدرولیز نشاسته، تست احیای نیترات و تست کاتالاز انجام شد (۱۰و۱۱ و ۱۲).

لازم به ذکر است که ۳ *Bacillus thuringiensis* و یک *Bacillus cereus* و یک *Bacillus subtilis* از بخش میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و با عنایت جناب آقای دکتر اخوان و یک *Bacillus cereus* و یک *Bacillus subtilis* نیز از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات دریافت شد.

روش استخراج پلاسمید: ابتدا باکتری‌ها را در۷ میلی لیتر محیط LB (لوریا برتانی براث) کشت داده و به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در $^{\circ}C$ ۳۰ همراه با حرکت دادن نمونه‌ها در ۱۲۰rpm قرار داده شد. بعد ۲ میلی لیتر از نمونه در ۱۳۹۰۰rpm برای ۷ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع سطحی را دور ریخته و به رسوب ۱۰۰ میکرولیتر بافر حلال (شامل ساکاروز ۱۵ درصد، Tris Hcl و EDTA) اضافه شد و چند دفعه با پی‌پت نمودن، مخلوط شد. سلول ها با اضافه نمودن ۲۰۰ میکرولیتر محلول متلاشی کننده (شامل base Tris و SDS ۳ درصد)، متلاشی شد. لوله ها در $^{\circ}C$ ۶۰ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و بعد میزان ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه شد و ۲۰ مرتبه معکوس شد تا با پروتئیناز K مخلوط گردد. لوله ها در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. در مرحله بعد یک میلی‌لیتر از مخلوط فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۵: ۲۴: ۱) به نمونه افزوده شد. سپس در ۱۳۹۰۰rpm به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شد و از مایع آبکی بالائی برای الکتروفورز استفاده شد (۸). در این آزمایش از مارکر ۱kb (شرکت فرمنتاز) استفاده شد که باندهای بالاتر از باند ۱۰۰۰۰bp و یا پائین‌تر از آن را مشخص می‌کند. بعد از الکتروفورز رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید (EtBr) انجام شد و بعد و از ژل، عکسبرداری و باندهای پلاسمیدی مشاهده شد.

برای تهیه نمونه پروتئین جهت انجام SDS-PAGE ۱۰ میلی‌لیتر از کشت شبانه باکتری به مدت ۵ دقیقه در دور ۸۷۰۰rpm سانتریفوژ شد. مایع سطحی دور ریخته شد. رسوب بجا مانده را در۱۰ میلی‌لیتر از (pH8/1) 30mM Tris HCl شناور ساخته و ورتکس شد. مجددا سلول‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۷۰۰rpm سانتریفوژ نموده و مایع سطحی آن دور ریخته شد. رسوب را در ۲۰۰ میکرولیتر از ۲۰٪ ساکاروز در 30 mM Tris HCl (pH 8/1) شناور ساخته و بعد، مخلوط را به لوله واکنش منتقل نموده و به مدت ۲ دقیقه روی یخ قرار داده شد و ۲۰ میکرولیتر از یک میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر لیزوزیم که در EDTA 1M ساخته شده بود به لوله اضافه شد. لوله ها را به مدت ۳۰ دقیقه در یخ خشک قرار داده و سپس ۱/۲۵ میلی‌لیتر (pH 7/3) 3mM EDTA را به آن اضافه نموده و بعد ورتکس لوله ها انجام شد. محتویات لوله ها به لوله سانتریفوژ منتقل شد و سر لوله با پارافیلم بسته شد و رسوب به مدت ۱۵۴ ثانیه در معرض سونیکاسیون قرار گرفت. سپس سلول‌ها با سانتریفوژ کردن به مدت ۵ دقیقه در ۸۷۰۰rpm رسوب داده شدند. مایع سطحی را به لوله واکنش جدید وارد نموده و رسوب دور ریخته شد. مایع سطحی یاد شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰rpm سانتریفوژ شد که

www.SID.ir

Archive of SID

در پی آن رسوب (ماده همراه با غشاء) و مایع سطحی (ماده محلول) تولید شد. ۱۰۰ میکرولیتر از مایع سطحی را به لوله واکنش جدید وارد کرده و به لوله حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از مایع سطحی، ۵۰ میکرولیتر از بافر 3x LUG اضافه شد. این نمونه تا زمان موردنیاز برای انجام SDS-PAGE در روی یخ نگهداری شد و مایع سطحی باقی مانده دور ریخته شد. رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر بافر 1x LUG شناور شده و بعد به لوله واکنش منتقل و تا زمان انجام SDS-PAGE در روی یخ قرار گرفت (۱۳و۱۴).

برای انجام SDS-PAGE ژل resolving با غلظت ۱۲ درصد و ژل stacking با غلظت ۱/۳ درصد استفاده شد. ابتدا ولتاژ ۸۵ ولت و بعد از نیم ساعت ۱۰۵ ولت به کار رفت. راندن ژل ۳ ساعت طول کشید و بعد ژل به مدت یک شب در محلول کوماسی بلو (comasi blue) جهت رنگ آمیزی گذاشته شد. روز بعد محلول رنگ بر را روی آن ریخته و هر یک ساعت محلول رنگ بر تازه به آن اضافه شد و این عمل آنقدر تکرار گردید که محلول رنگ بر شفاف ماند و سپس از ژل عکسبرداری شد (۱۵).

یافته‌ها

در رنگ آمیزی گرم، باسیل های گرم مثبت و میله ای شکل به رنگ بنفش مشاهده شد. پس از شناسایی باسیلوس های مورد نظر با تست های بیوشیمیایی استاندارد، مشخص شد که بالاترین میزان *B. cereus* جداسازی شده در ۳ استان یزد، کرمانشاه و تهران و پایین ترین میزان در استان های همدان و سمنان بود. در مورد *B.subtilis* ، بالاترین درصد جداسازی ارگانیسم ها در استان های کرمانشاه و یزد و خراسان رضوی و سمنان و میزان پایین جداسازی در ایلام، تهران، خوزستان وفارس بود. لذا بیشترین باسیلوس جدا شده از خاک، *B. cereus* با تعداد ۱۹ باسیلوس بود و مجموع *Bacillus cereus* و *B. subtilis* جدا شده در استان های کرمانشاه و یزد، بیشترین و کمترین مجموع *B. cereus* و *B. subtilis* جداسازی شده مربوط به خاک استان همدان بود (جدول ۱).

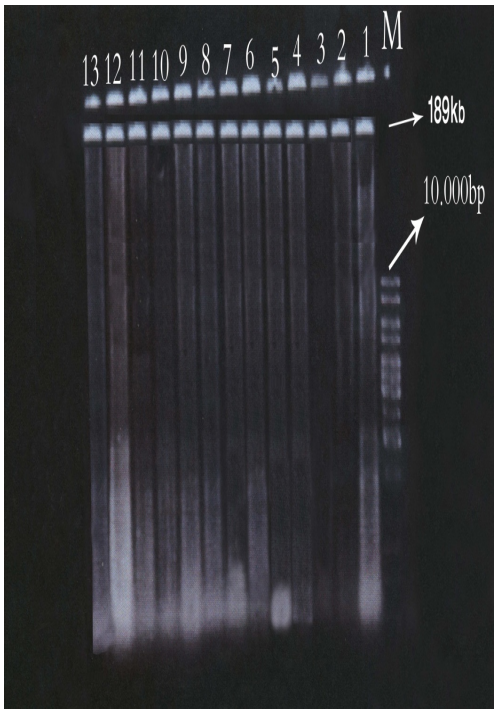
جدول ۱. تعداد باسیلوس های جدا شده از خاک و فراوانی نمونه های خاک هر استان

نوع باکتری / نام استان	B. cereus	B. subtilis	B. thuringiensis	مجموع فرا وانی نمونه خاک	
کرمانشاه	۳	۲	-	۵	۶
ایلام	۲	۱	-	۳	۱۰
همدان	۱	-	-	۱	۹
تهران	۳	۱	-	۴	۴
خراسان رضوی	۲	۲	-	۴	۷
یزد	۳	۲	-	۵	۹
سمنان	۱	۲	-	۳	۱۰
خوزستان	۲	۱	-	۳	۴
فارس	۲	۱	-	۳	۶
اهدایی	۲	۲	۳	**۷	-
کل	۲۱	۱۴	۳	*۳۸	۶۵

www.SID.ir

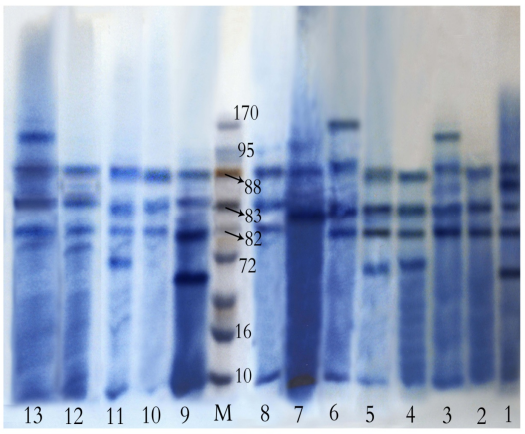
Archive of SID

با توجه به باندهای ظاهر شده در الکتروفورز ژل اگاروز و نظر به اینکه این باندها بالاتر از باند ۱۰۰۰۰bp مارکر بودند و همچنین با توجه به اینکه پلاسمید pXO1، 189kb و پلاسمید pXO2، 95kb اندازه دارد، وجود این پلاسمیدهای بزرگ در باکتری های مورد بررسی به تایید رسید (شکل ۱).



شکل ۱ . نتیجه الکتروفورز ژل اگاروز: شماره ۱ تا ۱۳ که در شکل مشخص است، همه Bacillus cereus **هستند. M*: مارکر به کار رفته تحت عنوان مارکر**۱kb **و ساخت شرکت فرمنتاز بود.**

پس از استخراج پروتئین‌ها از باکتری های مورد بررسی و انجام SDS-PAGE، باندهای پروتئینی در ۱۳ Bacillus cereus در سه موقعیت باندی 88kD ، 82kD و 83kD یعنی در موقعیت پروتئین های رمز شده توسط pXO1 ، ظاهر شدند. نتیجه SDS-PAGE، نتیجه الکتروفورز ژل اگاروز و انتقال pXO1 از *Bacillus anthracis* به ۱۳ *Bacillus cereus* را در ایران تایید نمود (شکل۲).



شکل ۲. نتیجهSDS-PAGE *M*: **مارکر در شکل مشخص است. این مارکر ساخت شرکت فرمنتاز** (Sm0671) **بود. در محل باند** 16kD **که مربوط به پروتئین رمز شده توسط پلاسمید** pXO2 **است، در هیچ کدام از باسیلوس ها باندی مشاهده نشد. شماره ۱ تا ۱۳ که در شکل مشخص است، همه** Bacillus cereus **هستند.**

لذا وجود باندهای پروتئینی مربوط به پلاسمید pXO1 اثبات شد و در محل باند 16kD که مربوط به پروتئین رمز شده توسط پلاسمید pXO2 است، در هیچ کدام از باسیلوس ها باندی مشاهده نشد.

بحث

پلاسمید pXO1 در *Bacillus anthracis* حاوی ژن‌های توکسین است و باعث ایجاد خواص سمی آن می‌گردد. دومین پلاسمید آن - pXO2 - حاوی ژن‌های سنتزکننده کپسول است، که برای خاصیت بیماریزائی ضروری می‌باشد. با توجه به اینکه در برخی از مطالعات، ژن مربوط به پلاسمید pXO، به خصوص pXO1 به باسیلوس‌های دیگر به خصوص *Bacillus cereus* انتقال یافته است، فراوانی ژن دو پلاسمید pXO در *Bacillus cereus*، *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus subtilis* با مشاهده باند پلاسمیدی در الکتروفورز و باند پروتئینی در SDS-PAGE در باسیلوس‌های مذکور در خاک مناطق مختلف ایران بررسی شد. از ۳۸ نمونه *Bacillus* آزمایش شده، در ۱۳ نمونه *Bacillus*

www.SID.ir

Archive of SID

cereus باند پلاسمیدی مربوط به پلاسمید pXO1 در الکتروفورز مشاهده شد. در SDS-PAGE نیز باندهای پروتئینی مربوط به پلاسمید pXO1 که مسئول رمز کردن توکسین در *B. anthracis* است در ۱۳ نمونه *B. cereus* مشاهده گردید، ولی باند پروتئینی مربوط به پلاسمید pXO2 که مسئول رمز کردن کپسول در *B. anthracis* است، در کل باسیلوس های مورد بررسی مشاهده نشد.

طی یک بررسی قطعه ای از پلاسمید pXO1 در *B.anthracis*، *B.cereus* و *B.thuringiensis* بررسی شد که در سه *Bacillus* ذکر شده کاملاً مشابه بود. در این مطالعه ۲۴ ایزوله *B. cereus* و *B. thuringiensis*، با تست واکنش زنجیر پلیمراز (PCR) بررسی شدند. در این آزمایش ها مشخص شد که یک ایزوله *B. cereus* بنام *B. cereus* DBT248 که در برخی کشورهای اروپائی به عنوان پروبیوتیک بکار می رود، فاقد پلاسمید pXO1 می باشد. پلاسمیدهای pXO1 که به عنوان شاهد استفاده شد، از سه *B.anthracis* جدا شده بود.

در پلاسمید برخی ایزوله ها یک قطعه که شباهت بسیار به قطعه موجود در پلاسمید pXO1 داشت، یافت شد. این قطعه بین پلاسمید pXO1 و پلاسمید دوازده *B. cereus* مورد آزمایش، تشابهی حدود ۹۰ درصد داشت. پس از اینکه این قطعه استخراج شد، اثر آن از نظر کشندگی روی سلول های تخمدان هامستر بررسی شد که تاثیری روی این سلول ها نداشت. نتایج این مطالعه نیز نشان داد که پلاسمید pXO1 به *B.cereus* و *B.thuringiensis* انتقال یافته است ولی به دلیل عدم وجود پلاسمید pXO2 در آنها فاقد خاصیت سمی بود که با مطالعه حاضر از این نظر که پلاسمید pXO1 به *B. cereus* انتقال یافته است، شباهت داشت (۷).

ژن های توکسین *B. anthracis* در *B. cereus* مرتبط با آن که نوعی بیماری شبیه سیاه زخم می داد، مورد بررسی قرار گرفت و پلاسمید حلقوی pBCXO1 که شباهت ۹۹٫۶ درصدی با پلاسمید pXO1 *B. anthracis* داشت، در *B.cereus* G9241 تشخیص داده شد. پس از آزمایش های متعدد مشخص شد وظیفه این پلاسمید احتمالا رمز کردن توکسین G9241 *B.cereus* همانند پلاسمید pXO1 در *B.anthracis*، می باشد. بیماری زایی *B.cereus* ذکر شده، از طریق آزمایش روی موش به اثبات رسید. در این تحقیق همچنین روی ژن هایی که پروتئین های کپسولی را رمز می کنند و مشابه آنها در پلاسمید pXO2 در *B.anthracis* وجود داشت، مطالعه شد که نتایج آن عدم شباهت این ژن ها با ژن های مسئول رمز کردن کپسول در *B. anthracis* بود. آزمایش های فنوتیپی انجام شده روی G9241 *B. cereus* در این مطالعه، نشان داد که G9241 *B. cereus*، توانایی به وجود آوردن نوعی بیماری شبیه سیاه زخم را دارد و علایمی بسیار مشابه مراحل اولیه ابتلا به سیاه زخم را در موش ایجاد کرد (۸). با توجه به نتیجه مطالعه فوق و اثبات وجود پلاسمید مشابه pXO1 و عدم وجود پلاسمید pXO2 در ایزوله G9241 *B. cereus*، شباهت مطالعه فوق با مطالعه حاضر بسیار زیاد بود.

در مطالعه ای ایزوله های مختلف *Bacillus cereus* که دارای پلاسمیدهای متعدد بودند، بررسی شدند. در این مطالعه پلاسمیدهای pPER272 و pCER270 که دارای ژن های شبیه pXO1 بودند، بررسی شدند و مشخص شد هر دو پلاسمید (pPER272 و pCER270) شبیه هم بوده و دارای ژن هایی بودند که این ژن ها روی کروموزوم اعضای گروه *cereus* هم یافت شدند. این پلاسمیدهای بزرگ به عنوان ناقل در گروه *cereus* و در بین اعضای آن، عمل می کنند. بررسی پلاسمید pCER270 منجر به شناسایی نواحی شد که با بیماری زایی باکتری مرتبط بودند. بر اساس نتایج این بررسی ها، پلاسمید pCER270 ارتباط بسیار نزدیکی با پلاسمید pXO1 داشت. در این تحقیقات اثبات شد که پلاسمیدهای بررسی شده این مطالعه، در تغییرات ژنتیکی بین کروموزوم ها و پلاسمیدها در بین اعضای گروه *cereus* نقش دارند. بررسی ها در مورد توالی های کروموزومی گونه های حاوی دو پلاسمید فوق و تلاش برای پیدا کردن تشابه بین ژن های آنها ادامه دارد. از مطالعه فوق این نتیجه حاصل شد که پلاسمید pPER272 تشابه زیادی با پلاسمید pBC10987 دارد. لذا وجود پلاسمیدهای شبیه pXO1 در *Bacillus cereus* در مطالعه فوق اثبات شد و عدم بیماری زایی این ایزوله ها علیرغم وجود این پلاسمیدها، ممکن است ناشی از عدم دارا بودن ساختار کامل pXO1 باشد (۹). این مطالعه شبیه

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهش حاضر بود و وجود pXO1 در *Bacillus cereus* در هر دو مطالعه تایید شد.

نتیجه گیری

پلاسمید pXO1 از *Bacillus anthracis* به *Bacillus cereus* در ایران منتقل شده است ولی به دلیل اینکه *Bacillus cereus* پلاسمید pXO2 را ندارد، هنوز بیماری زا نیست و توجه جدی به این مسئله ضروری است.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر اخوان و بخش میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال که در فراهم نمودن چند نمونه باسیلوس مساعدت نمودند، کمال تشکر را دارم.

References

1- Amadio AF, Benintende GB, Zandomeni RO. *Complete sequence of three plasmids from Bacillus thuringiensis environmental isolate and Comparison with related plasmids from the Bacillus cereus group.* Plasmid. 2009; 172 -82.
2- Delvecchio V, Connolly J, Alefantis T, Walz A, Quan M, Patra G. *Proteomic profiling and Identification of Immunodominant Spore Antigens of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis*. Applied Environmental Microbiology. 2006; 72(9): 6355-63.
3- Koehler T M. *Bacillus anthracis genetics and virulence gene regulation.* Current topics in microbiology and Immunology. 2002; 143-64.
4- Han CS, Xie G, Challacombe JF, Altherr MR, Bhotika SS, Bruce D. *Pathogenomic Sequence analysis of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis isolates closely related to Bacillus anthracis.* J Bacterio. 2006; 188: 3382 - 90.
5- Pannucci J, Okinaka R, Sabin R, Kuske C. *Bacillus anthracis pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species.* Journal of Bacteriology. 2002; 184(I): 134 -41.
6- 6. Sakai H, Howlader M, Ishida Y, Nadaguci A, Oka K, Ohbayashi K. *Replacement of domain lll of cry insecticidal proteins from Bacillus thuringiensis.* Journal of bioscience and bioengineering. 2007; 103: 381 -3.
7- Kim k, Seo J, Wheeler K, Park C, Kim D, Park S. *Rapid genotypic detection of B.anthracis and the B.cereus group by multiplex real-time PCR melting curve analysis.* FEMS.2005; 301 -10.
8- Andrup L, Barfod KK, Jensen GB, Smidt L. *Detection of large plasmids from the Bacillus cereus group.* Plasmid Elsevier. 2008; 59:139 -43.
9- Geraldine A, Andrup L, Mahillon J. *Conjugative plasmid PAW63 brings new in sights into the genesis of the B.anthracis Virulence plasmid pXO2.* BMC Genomics. 2005; 1471- 2164.
10- Xiaomin Hu, Munk H B, Bohse H N, Yuan Z. *Detection and phylogenic analysis of one anthrax virulence plasmid pXO1 conservative ORF ubiquitous presented within Bacillus cereus group.* Biochemical and Biophysical Research. 2006; 214-9.
11- Hoffmaster AR, Chapman GD, Chute MD, Marston CK, Mayer LW, Maiden MC. *Identification of anthrax toxin genes in a Bacillus cereus associated with an illness resembling inhalation anthrax*. Proc Natl Acad Sci. USA. 2004; 101: 8449 -54.
12- Rasko DA, Rosovitz MJ, Okstad OA, Fouts DE, Jiang L, Cer RZ. *Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal Bacillus cereus isolates reveals a common evolutionary history among the B. cereus-group plasmids, including Bacillus anthracis pXO1*. Journal of bacteriology. 2007; 189(1): 52.
13- Peter J, White JM. *Selective isolation of Bacillus sphaericus from soil by use of acetate as the only major source of carbon.* Applied and Environmental Microbiology. 1985; 1478-81.
14- Barritt MM. *The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α-naphtol.* J Pathol Bacteriol. 1936; 42: 441-445.
15- Berber I. *Characterization of Bacillus species by numerical analysis of their SDS-PAGE protein profiles.* J Cell Mol Biol. 2004; 3: 33-7.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir