Archive of SID

توزیع ژن CtpA در بین لیستریامونوسیتوژنزهای جدا شده از منابع مختلف

جمیله نوروزی .Ph.D☆*

☆ دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه میکروبیولوژی

آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۴۱۵۵-۶۱۸۳، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه میکروبیولوژی

چکیده

* **هدف:** بررسی توزیع ژن CtpA در بین لیستریامونوسیتوژنزهای جدا شده از محیط اطراف و بررسی نمونه‌های پاتولوژی و آزمایشگاهی

* **مواد و روشها:** با استفاده از واکنش زنجیره پلی مراز (PCR: Polymerase Chain Reaction)، وجود CtpA در DNA کروموزومی از ۶۹ باکتری جدا شده جستجو شد که ۳۸ درصد آنها حاوی این ژن بودند.

* **یافته‌ها:** لیستریامونوسیتوژنزهای حاوی این ژن بودند. ژن CtpA از ۹۰ درصد نمونه‌های کلینیکی و لبنیات، ۸۵ درصد نمونه‌های محیطی و ۷ درصد نمونه‌های حاصل از گوشت مرغ و گوسفند به دست آمد.

* **نتیجه‌گیری:** احتمالاً میزان CtpA در نژادهای لبنیاتی و کلینیکی می‌تواند ارتباط آنها را با عفونت کلینیکی نشان دهد. وجود میزان کم CtpA در نمونه‌های به‌دست آمده از مأکیان ممکن است نشان دهندهٔ آن باشد که این نژاد، ارتباط چندانی با بیماری ندارد.

کل واژگان: لیستریامونوسیتوژنز، CtpA، Hpa-1، SPP-1، PCR

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لیستریامونوسیتوژنز باکتری گرم مثبتی است که در محیط اطراف یافت می‌شود و عامل بیماریهای شدیدی نظیر عفونتهای قبل و بعد از تولد، سپتی سمی و منتژیت در انسان و حیوان است (۱). این باکتری از راه غذای آلوده مانند شیر پاستوریزه شده (۲)، پنیر نرم (۳)، سبزیجات خام (۴)، سوسیس و سالاد آمادهٔ فروش و... به انسان منتقل می‌شود. موارد کم عفونتهای کلینیکی با این باکتری نشان می‌دهد که لیستریامونوسیتوژنز، بیماریزای شایعی در انسان نیست. اما به علت میزان بالای مرگ (حدود ۲۰ تا ۵۰ درصد) و توانایی در ایجاد عفونتهای اپیدمی، اهمیت آن به عنوان بیماریزای عمده مورد توجه قرار گرفته است (۶). به علاوه، این باکتری یکی از علل عمده منتژیت در بیمارانی است که سیستم ایمنی آنها مختل شده است (۷).

عوامل بیماری زایی که نقشی در پاتوژنز عفونتهای لیستریامونوسیتوژنز به عهده دارند توسط Portnoy (۸)، Sheehan (۹) بررسی شده است. به هر حال، ممکن است عوامل دیگری که بر حیات سلول اثر دارند در برقراری عفونت دخالت داشته باشند. برای مثال، تعداد زیادی از نژادهای لیستریامونوسیتوژنز به کاتیونهای فلزات سنگین مانند کادمیم مقاوم هستند (۱۰). در این مورد، مقاومت توسط شاخص CadA اعطا می‌گردد و پروتئین ATP آز نوع P در انتقال کادمیم دخالت می‌کند (۱۱). محققان برخی پروتئینهایی را که در انتقال یون کادمیم یا مس در سایر باکتریها دخالت دارند گزارش کرده‌اند؛ مانند CadA در استافیلوکوک آئرئوس (۱۲)، CadA در B.firmus (۱۳)، Pacs در Synechococcus (۱۴) CadA در Synechococcus (۱۵)، CopA و CopB در E. hirae (۱۶)، CopA در هلیکوباکترپیلوری (۱۷) و Orf در هلیکوباکتر پیلوری (۱۸).

در سال ۱۹۹۶ Francis و Thomas (۱۹، ۲۰) ژنی را در لیستریامونوسیتوژنز به نام CtpA شناسائی کردند که پلی‌پپتیدی با ۶۵۳ اسید آمینه راکد می‌کند و شباهت بسیار زیادی به کاتیون انتقال ATP آز از نوع P دارد (Genbank Accession Number: U 15554). این پروتئین به خانواده‌ای از پروتئینها شباهت دارد که در انتقال یون مس در ایوکاریوتها و پروکاریوتها دخالت می‌کند. موتانتهایی از لیستریامونوسیتوژنز به غلظت کم یون مس در محیط کشت بسیار حساس بوده و رونوشت‌های این ژن به طور فوق‌العاده‌ای دراین شرایط افزایش می‌یابد. با توجه به پراکنده بودن لیستریامونوسیتوژنز در محیط اطراف نقش مهم CTPA را در زنده ماندن این ارگانیزم در محیط طبیعی از طریق انتقال یون مس نشان می‌دهد.

هدف این بررسی، آنالیز و یافتن ژن انتقال دهندهٔ مس (CtpA) در لیستریامونوسیتوژنز به‌دست آمده از محیط اطراف، نمونه‌های کلینیکی و لبنیاتی موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آدلاید استرالیا بود. این ژن در بیماری‌زایی و حیات این باکتری دخالت دارد.

مواد و روشها

نژادهای مختلف لیستریامونوسیتوژنز که در این آزمایش به‌کار رفت در آزمایشگاه بخش میکروبیولوژی دانشگاه آدلاید استرالیا در محلول گلیسرول و پپتون در ۷۰°- سانتی‌گراد نگهداری شده بود. کلونیهای مفرد لیستریامونوسیتوژنز باکشت خطی در محیط BHI[1] و نگهداری به‌مدت یک شب در حرارت ۳۷° سانتی‌گراد تهیه شد. سپس این کلونیها برای بررسیهای بعدی استفاده شد.

* تهیه DNA کروموزومی از لیستریامونوسیتوژنز

DNA کروموزومی از لیستریا با روش اصلاح شده Flamm به دست آمد. غلظت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر یا به وسیله الکتروفورز در ژل آگاروز اندازه‌گرفته شد.

الکتروفورز در حرارت اتاق با غلظت ۱ تا ۲ درصد ژل آگاروز در محلول بافر TAE انجام شد. غلظت آگارز به اندازه قطعات DNA به‌کار رفته بستگی داشت. محلول بافر TAE شامل EDTA, Tris[2] و اسیداستیک بود. ژل توسط محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و در زیر نور ماورای‌بنفش مشاهده و عکسبرداری شد.

اندازه قطعات DNA با مقایسه حرکت نسبی آنها با دی‌اکسی‌ریبونوکلئیک اسید از Spp-1 محاسبه شد. DNAی Spp-1، باکتریوفاژ حاصل از باسیلوس سوبتیلیس است که توسط EcoR-1 بریده شده است.

* واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR)

تمام PCRهای انجام شده در این بررسی مطابق شرایط معمولی انجام شد. درجه حرارت دستگاه PCR با ۹۴° سانتی‌گراد (دناتوره شدن) به مدت ۳ دقیقه (یک چرخش) شروع شد و با ۹۴° سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد (حرارت annealing) به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲° سانتی‌گراد (extension) به مدت ۳ دقیقه (۳۰ چرخش) و ۷۲° سانتی‌گراد (Stabilization) به مدت ۴ دقیقه (یک چرخش) و توقف در ۴° سانتی گراد به پایان رسید.

* جدا کردن قطعات DNA از ژل آگارز

قطعات DNA با استفاده از فنل به‌دست آمد. در این روش DNA حاصل از PCR را که به روش استاندارد الکتروفورز شده بود از ژل آگارز بدون استفاده از اتیدیوم بروماید یا نور ماورای بنفش با تیغ استریل بریده شد. سپس یک میلی‌لیتر از فنل به هر گرم آگارز افزوده شده توسط ورتکس به خوبی مخلوط شد و در حرارت ۷۰°- سانتی‌گراد به مدت یک ساعت نگهداری شد. بعد از سانتریفوژ، کلروفرم را به آن اضافه و سپس DNA با افزودن اتانول ۱۰۰ درصد و استات سدیم به‌دست آمد.

* آماده کردن DNA برای تعیین توالی با استفاده از dye-terminator

از کیت dye-terminator مطابق دستور کارخانه سازنده آن برای

1. Brain Hears Infusion Agar
2. Ethylenediamine tetraacetic acid

www.SID.ir

Archive of SID

آماده کردن و تعیین توالی DNA استفاده شد. در این روش به فرآورده PCR از DNA الگو (CtpA) که در روی ژل خالص شده بود، محلول dye-terminator و پرایمرها افزوده شد و حجم مخلوط توسط آب به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس ۴۰ میلی‌لیتر از روغن معدنی به آن اضافه شد و در دستگاه PCR گذاشته شد. برنامه حرارتی دستگاه PCR مطابق دستور کارخانه سازنده کیت انجام شد. سپس فرآورده PCR با افزودن ۹۵ درصد اتانول و استات سدیم خالص شد و با اضافه کردن اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. پس از خشک کردن در دستگاه با استفاده از متوالی کننده[1] اتوماتیکی، توالی DNA مشخص شد.

◆ هضم DNA از CtpA توسط اندونوکلئاز

آنزیم اندونوکلئاز Hpa-1 با عمل برندگی با استفاده از بافر مخصوص که توسط کارخانه سازنده آن ارائه شده بود برای برش DNA از CTPA به کار رفت. این واکنش به غلظت DNA و حجم مورد نیاز بستگی دارد.

یافته‌ها

تجربیات اولیه در راستای تعیین بهترین شرایط PCR برای تقویت[2] ژن CtpA، با لیستریامونوسیتوژنز نژاد DRDC8 و DTS22 انجام شد. این عمل با تغییر درجه حرارت، تغییر مقدار کلرور منیزیم و سایر شرایط صورت گرفت و بهترین شرایط با غلظت ۲۵ میکرومولار کلرور منیزیم در حرارت °۹۴ سانتی‌گراد دناتوره شدن به مدت ۳ دقیقه (یک چرخش)، °۵۵ سانتی‌گراد (annealing) به مدت ۳۰ ثانیه، °۷۲ سانتی‌گراد (extension) به مدت ۳ دقیقه (۳۰ چرخش) و °۷۲ سانتی‌گراد (stabilization) به مدت ۴ دقیقه (یک چرخش) حاصل شد.

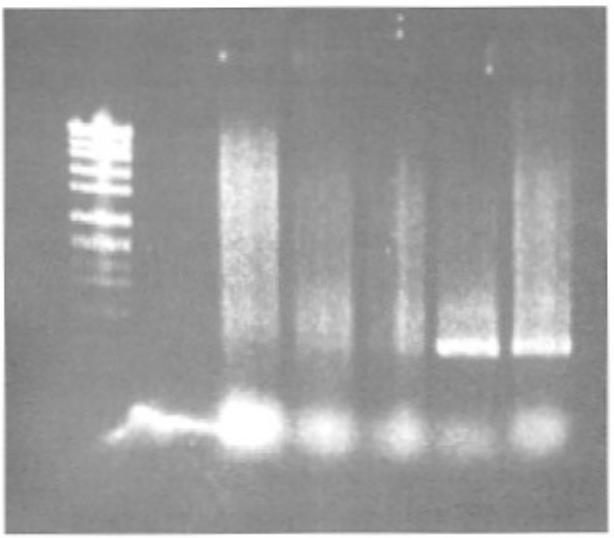
بعد از هضم از DNA ویژه CTPA که با آنزیم اندونوکلئاز با عمل برندگی به نام Hpa-1 انجام شد، دو بند به اندازه ۱۷۶ bp و ۳۸۲ bp در مقایسه با Spp-1 در ژل الکتروفورز انجام شد که مجموع برابر ۵۵۸ bp (۰/۵۵۸ kbp) بود.

در این بررسی، ۶۹ لیستریا که قبلاً از مناطق متفاوتی (محیط، بیمار، لبنیات) جدا شده بود مورد استفاده قرار گرفت. PCR برای تقویت DNA ویژه CTPA در تمام موارد به کار رفت. در ۳۸ درصد لیستریامونوسیتوژنزها، بندی به اندازه ۵۵۸ pb در ژل الکتروفورز بعد از هضم با اندونوکلئاز Hpa-1 به‌دست آمد. CtpA در برخی از لیستریاهای مورد بررسی پس از انجام PCR مشاهده شد.

در تمام موارد، پس از انجام PCR، ژل الکتروفورز انجام شد و پس از مقایسه با نشانگر Spp-1، بندی به اندازه ۵۵۸ bp در روی ژل مشاهده و عکسبرداری شد که نشان دهندهٔ وجود CTPA بود. مقایسه شمائیکی نژادهای DRDC 8 لیستریامونوسیتوژنز و سایر نژادهای بیماریزا و غیر بیماریزا برای بررسی DNAی CTPA در ژل الکتروفورز در شکل ۱ نشان داده شده است.

لیستریامونوسیتوژنز حاوی ژن CtpA از ۹۰ درصد نمونه‌های کلینیکی و لبنیات، ۸۵ درصد نمونه‌های محیطی و ۷ درصد نمونه‌های حاصل گوشت مرغ و گوسفند به‌دست آمد.

پس از انجام PCR، DNA ویژه CtpA از نژاد DTS22 بر روی ژل آگارز خالص و جمع آوری و با استفاده از کیت dye-terminator مجدداً عمل PCR مطابق دستور کارخانه سازنده کیت انجام و خالص شد و توالی نوکلئوتیدهای CtpA به‌دست آمد.



شکل ۱: مقایسه شمائیکی نژادهای مختلف لیستریامونوسیتوژنز حاوی ژن CtpA و فاقد آن

بحث

مقدار بسیار کم مس به‌عنوان کوفاکتور در برخی از آنزیمها، نیاز عمده غذایی برای تمام سلولهای زنده است (۲۲). اما چنانکه مقدار مس زیاد باشد برای سلول کشنده است. به‌نظر می‌رسد که باکتریها نیز دارای یک سیستم انتقال یون مس هستند (۲۳) که در زنده ماندن باکتریها ضروری است. اخیراً پروتئینهای ATPآز از نوع P که در انتقال مس دخالت دارند در هلیکوباکتر پیلوری شناسائی شده است که در بیماریزایی این پاتوژن، سهولت تشکیل کلونی در معده و زنده ماندن آن در معده انسان را به عهده دارد (۱۷، ۱۸). در هنگام عفونت، سلولهای ایوکاریوتی میزبان در معرض تغییرات عمده‌ای در غلظتهای عناصر کمیاب در سرم قرار می‌گیرند (۲۴). برای مثال، غلظت یون مس در کبد موش در هنگام عفونت انگلی به مقدار عمده‌ای کاهش می‌یابد (۲۵، ۲۶). بنابراین ممکن است CtpA نقش عمده‌ای در سازش انتخابی لیستریامونوسیتوژنز در محیط اطراف به عهده داشته باشد. لیستریامونوسیتوژنز ممکن است برای زنده ماندن مکانیزمهایی داشته باشد که مس را به‌وسیلهٔ عمل CTPA از سلولهای آلوده به‌دست آورد.

وجود ژن CtpA در لیستریامونوسیتوژنز برای پایداری و ایجاد بیماری در موش آلوده ضروری است (۲۰). چون وجود

1. Sequencer
2. Amplification

www.SID.ir

Archive of SID

CtpA در عفونتهای باکتریایی اهمیت دارد، توزیع آن در بین لیستریامونوسیتوژنزهای جدا شده از محیط اطراف، نمونه‌های پاتولوژی و آزمایشگاهی موجود در دانشگاه آدلاید استرالیا بررسی شد. با استفاده از PCR، وجود DNA ویژه CtpA در ۶۹ باکتری لیستریامونوسیتوژنز بررسی شد که ۳۸ درصد آنها دارای CtpA بودند.

ژن CtpA ابتدا در لیستریامونوسیتوژنز نژاد DRDC8 یافت شد که از محیط اطراف در استرالیا به‌دست آمد. این باکتری ممکن است از نظر ژنتیکی با لیستریامونوسیتوژنزهای جدا شده از کشورهای دیگر متفاوت باشد. بر اساس این فرضیه که CtpA در لیستریامونوسیتوژنز وجود دارد، PCR برای شناسائی CTPA مشابه در سایر ایزوله‌های محیطی، کلینیکی و آزمایشگاهی استفاده شد.

با توجه به اینکه با استفاده از PCR، نتایج منفی کاذب یا مثبت کاذب حاصل نمی‌شود، پس این یافته‌ها احتمالاً نشان دهنده آن است که تمام نژادهای لیستریامونوسیتوژنز، خاصیت بیماری زایی یکسانی ندارند. از طرف دیگر، نتایج PCR به جفتهای پرایمر الیگونوکلئوتیدی به‌کار رفته بستگی دارد و بعضی از باکتریها جدا شده ممکن است حاوی تغییراتی در توالی نوکلئوتیدی باشند که از اتصال پرایمرها جلوگیری می‌کند و نتایج منفی کاذب حاصل می‌شود. بنابراین، برای غلبه به این محدودیت آنالیز PCR باید همراه با آزمایش هیبریداسیون ساترن از قطعات DNA ویژه CtpA انجام شود.

جالب توجه است که آنالیز PCR نشان داد که DNA ویژه CtpA از لیستریامونوسیتوژنز به طور عمده از لیستریامونوسیتوژنزهای جدا شده از لبنیات و نمونه‌های کلینیکی در استرالیا یافت شد (۲۷) و در موارد کمتری از لیستریامونوسیتوژنزهای جدا شده از مرغ و خروس به‌دست آمد. این امر احتمالاً نشان می‌دهد که نژادهای اخیر در بیماری کلینیکی دخالت چندانی ندارند. نتایج مطالعه حاضر نیز تأییدکننده این یافته‌هاست به طوری که ژن CtpA در ۹۰ درصد نمونه‌های کلینیکی و لبنیات، ۸۵ درصد نمونه‌های محیطی و ۷ درصد نمونه‌های حاصل از گوشت مرغ و گوسفند مشاهده شد. در هر حال، این امر به بررسیهای بیشتر و نمونه‌های بیشتر از مناطق مختلف دنیا نیاز دارد.

References

1. Gellin BG, CV Broom: Listeriosis. J Am Med Assoc 1989; 261: 1313-1320
2. Fleming DW, Cochi SL, Mac Donald KL, Brondum J Hayes PS, Plikaytis BD, Holmes MB, Audurier A, Broome CV, Reingold AL: Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis N Engl. J Med 1985; 312: 404-407
3. Linnan MJ, Moscola L, Lou XD, Goulet V, May S, alminen C, Hird DW, Yonekura ML, BD, Hayes P, weaver R, Audurier A, plikaytis, Fannin SL, kleks A, Broome CL: Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese N Engl J Med 1988; 319: 823-828
4. MC Lauchlin JA, Listeria monocytogenes, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. J App1 Bacteriol 1987; 63: 1-11
5. Farder JM, Daley E, Coates F, Beausoleil N, Fournier J: Feeding trials of L.monosytogenes with a non-human primate model. J Clin Microbiol 1991; 29: 2606-2608
6. Bille J, Doyle MP: Listeria and Erysipelothrix. In Manual of clinical Microbiology. Lennette EH, Balows A WJ Hausler Jr, shadomy HJ (eds). American Society for Microbiology, Washington, DC, 1991, pp 287-295
7. Nieman RE, Lorber B: Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature, 1986-1978; Rev Infect Dis 1980; 2: 207-227
8. Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W, Cossart P: Molecular determinants of Listeria monocytogenes pathogenesis. Infect Immun 1992; 60: 1263-1267
9. Sheehan B, Kocks C, Dramsi S, Gouin E, Klarsfeld AD, Mengaud J: Cossart Molecular genetic determinants of the Listeria monocytogenes infectious process. Curr Top Microbiol Immunol 1994; 192: 182-216
10. Ledrun M, Loulergue J, Chaslus-Dancla E, Audurier A: Plasmids in Listeria monocytogenes in relation to cadmium resistance. Appl Environ Microbiol 1992; 58: 3183-3186
11. Ledrun M, Audurier A, Cossart P: Plasmid-borne cadmium resistance genes in Listeria monocytogenes are similar to cad A and cad C of staphylococcus aureus and are induced by cadmium J Bacteriol 1994; 176: 3040-3048
12. Nucifora G, Chu L, Misra TK, Silver S: Cadmium resistance from Staphylococcus aureus plasmid PI258 cad A gene results from a cadmium-efflux ATPase. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3544-3548
13. Ivey DM, Guffanti AA, Shen Z, kudyan N, Kurlwich TA: The cad C gene product of alkaliphilic Bacillus firmus OF4 partially restores Na resistance to a Escherichia coli strain lacking an Na/H antiporter (NhaA). J Bacteriol 1992; 174: 4878-4884
14. Kanamaru K, Kashiwagi S, Mizuno T: The cyanobacteriam, Synechococcus cp. PCC 7942, Possesses two distinct gene encoding cation-transporting P-type ATPases. FEBS Letts 1993; 330: 99-104

www.SID.ir

Archive of SID

15. Phung LT, Ajlani G, Haselkom R: P-type ATPase from the cyanobacterium synechococcus 7942 related to the human menkes and wilson disease gene products. Proc Natl Asad Sci USA 1994; 91: 9651-9654
16. Odermatt A, surter H, Krapf R, Solioz M: Primary structure of two P-type ATPase involved in copper homeostasis in Enterococcus hirae. J Biol Chem 1993; 268: 12775-12779
17. Ge Z, Hiratsuka K, Taylor DE: Nucleotide sequence mutational analysis indicate that two Helicobacter pylori genes encode a P-type ATPase and cation-binding protein associated with copper transport. Mol Microbiol 1995; 15: 97-106
18. Melchers K, Weitzenegger T, Buhmann A, Steinhiber W, Sachs G, Schafer KP: cloning membrane topology of a P-type ATPase from Helicobacter. J Biol Chem 1996; 271: 446-457
19. Fancis MS, Thomas CJ: Analysis of Multiplicity of infection J Med Microbial 1996; 45: 323-330
20. Francis MS, Thomas CJ: The listeria monocytogenes gene CTPA encodes a putative P-type ATPase involved in copper transport. Mol Gan Genet 1997; 235: 484-491
21. Flamm RK, Hinrichs DJ, Thomaslow MF: Introduction of pAM ß1 into Listeria monotocytogenes by conjugartion and homology between native L. monocytogenes Plasmids. Infect Immun 1984; 44: 157-161
22. Brown NL, Rouch DA, Lee BTO: Copper resistance determinants in becteria. Plasmid 1992; 27: 41-51
23. Brown NL, Lee BTO: Silver in metal ions in biological systems. H Sigel, A Sigel (eds). Ddeker, New York, 1994, pp 405-434
24. Beisel WR: Magnitude of the host nutritional responses to infection. AM J Clin Nutr 1997; 30: 1236-1247
25. Matousek de Abel de la, Cruz AJ, Burguera M, Anez N: Changes in the total content of iron, copper and zinc in serum, heart, liver, spleen, and skeletal muscle tissues of rats infected with Trypanosoma cruzi. Biol Tract Elem Res 1993; 37: 51-70
26. Crocker A, Lee C, Aboko-Cole G, Durham C: Interaction of nutrition and infection: Eeffect of copper deficiency on resistance to trypanosomal lewisi J: Nutr Med Assoc 1992; 84: 697-706
27. Thomas CJ: PCR, RAPD, RELP and PFGE methods for screening isolates of Listeria monocytogenes. In proceeding of the 12th screening isolates of Listeria monosytogenes. In proceeding of the 12th international symposium on problems of Listeriosis. Listeria Methods workshop. Manoul, 2-6 October, Perth, Australia, 1995, pp 84-101

www.SID.ir