

شناسایی ژن شیگاتوکسین به وسیله روش Multiplex PCR

امیر همایون کیهان^۱ M.Sc.، مجتبی سعادت^۲ Ph.D.، احمد کریمی راهجردی^۳ M.Sc. و مهدی کمالی^۴ M.Sc.

آدرس مکاتبه: * دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... «ع» - بیمارستان قلب جماران - تهران - ایران

** دانشگاه امام حسین (ع) - دانشکده علوم پایه - گروه علوم زیستی - تهران - ایران

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۴/۱۰/۱۴ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۲/۳۱ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۵/۳/۱۱

خلاصه

مقدمه: زیر گونه‌های STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*) و بیوتایپ ۱ شیگلا دیسانتری باعث ایجاد اسهال، کولیت هموراژیک و ناهنجاری‌های بدخیم سیستم مجاری ادراری (HUS Hemolytic Uremic Syndrome) در انسان می‌شوند. بسیاری از نشانه‌های کلینیکی این بیماری در اثر تولید شیگاتوکسین ۱ (Stx1) و شیگاتوکسین ۲ (Stx2) و یا مجموعه‌ای از هر دو نوع توکسین پدید می‌آید. این تحقیق جهت شناسایی ژن این توکسین‌ها به وسیله روش ملکولی صورت گرفته است.

مواد و روش کار: برای شناسایی ژن‌های *stx2* و *stx/stx1* تکنیکی براساس Multiplex PCR به همراه ژن مالات دهیدروژناز (*mdh*) موجود در دو باکتری *E. coli* و شیگلا طراحی شده است. مجموعه‌ای از ۶ پرایمر استفاده شده است: SFI و SRI یک قطعه ۱۹۹ bp از ژن *mdh* را تولید می‌کنند که به‌عنوان یک کنترل مثبت (Internal positive control) برای صحت واکنش عمل می‌کند، Ka2F و Ka2R یک قطعه ۳۸۱pb از ژن *stx2* را تولید و Ka1F و Ka1R یک قطعه ۶۲۲pb از ژن *stx/stx1* را تولید کنند. جهت تایید محصولات واکنش از فرآیند هضم آنزیمی و تعیین توالی استفاده شد.

نتایج: محصولات PCR ژن‌های *stx/stx1* و *stx2* و *mdh* تنها در *E. coli* O157:H7 به‌طور هم‌زمان مشاهده شد و در بیوتایپ ۱ شیگلا دیسانتری تنها قطعه مربوط به *stx/stx1* و *mdh* مشاهده گردید. در ژنوم تخلیص شده از دیگر باکتری‌های گرم منفی قطعات مربوط به توکسین مشاهده نشد. فرآیند هضم آنزیمی و تعیین توالی صحت قطعات تکثیر شده را مورد تایید قرار داد. حساسیت واکنش PCR برای شناسایی ژن شیگاتوکسین ۱ از ۲/۱pg/μl از ژنوم باکتری و معادل ۳۲۰ cfu/μl بود.

بحث: واکنش طراحی شده قادر به شناسایی ژن‌های *stx/stx1*، *stx2* و *mdh* می‌باشد. *E. coli* O157:H7 قادر به تولید هر دو نوع شیگاتوکسین و بیوتایپ ۱ شیگلا دیسانتری تنها قادر به تولید نوع ۱ شیگاتوکسین می‌باشند. با بررسی‌های انجام شده بر روی قطعات تکثیر شده و مقایسه آن‌ها با بانک ژنوم مشخص شد که قطعه در نظر گرفته شده برای تکثیر *stx2* در تمامی انواع این ژن وجود دارد، در نتیجه جهت شناسایی آن‌ها مناسب می‌باشد. این روش وسیله‌ای مناسب جهت تشخیص انواع شیگاتوکسین‌ها می‌باشد چرا که سریع، اختصاصی، حساس و ارزان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: شیگاتوکسین، شیگلادیسانتری، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندتایی، اسهال

۲- استادیار - دانشگاه امام حسین (ع)

۴- کارشناس ارشد - دانشگاه امام حسین (ع)

۱- کارشناس ارشد - بیمارستان جماران - نویسنده مسئول

۳- کارشناس ارشد - دانشگاه امام حسین (ع)

مقدمه

در سال ۱۹۸۹ H. Karch و T. Meyer از تکنیک PCR جهت شناسایی ژن‌های شیگاتوکسین استفاده کردند. این محققین از یک جفت پرایمر جهت شناسایی ژن‌های مختلف شیگاتوکسین یعنی *stx2*, *stx/stx1* استفاده کردند. در ضمن جهت شناسایی محصول PCR از ژل الکتروفورز و رنگ‌آمیزی DNA با اتیدیوم بروماید استفاده کردند که ساده‌ترین روش شناسایی جهت محصولات PCR می‌باشد. جهت تأیید محصولات PCR نیز از دو پروب الیگونوکلئوتیدی ۲۰bp که مکمل آن‌ها در درون قطعات تکثیر شده قرار دارد بهره بردند. [۱۲]

با توجه به این‌که این توکسین دارای تنوع ژنتیکی است شناسایی آن طی یک واکنش PCR کار مشکلی خواهد بود، به همین دلیل محققین درصدد برآمدند تا با بررسی توالی ژن انواع شیگاتوکسین نسبت به طراحی پرایمرهایی که بتوانند به‌وسیله آن‌ها انواع این توکسین را مورد شناسایی قرار دهند، اقدام کنند. از آنجایی که باکتری‌های تولید کننده این توکسین در اغلب موارد دارای فاکتورهای ویروالانس دیگری نیز می‌باشند محققین سعی کردند با طراحی واکنش‌های Multiplex PCR علاوه بر شناسایی شیگاتوکسین، دیگر عوامل حدت‌زا را نیز مورد شناسایی قرار دهند. [۱۶]

در این مطالعه یک واکنش Multiplex PCR طراحی شده که در آن از دو جفت پرایمر جهت شناسایی انواع ژن شیگاتوکسین جدای از تفاوت‌هایی که از نظر توالی با یکدیگر دارند استفاده شده است. همچنین از یک جفت پرایمر جهت تکثیر قطعه‌ای از ژن مالات دهیدروژناز (*mdh*) که در ارگانسیم‌های مولد این توکسین وجود دارد به عنوان کنترل مثبت داخلی استفاده شده است.

مواد و روش کار

باکتری‌ها و محیط‌های کشت مورد استفاده: باکتری‌های مورد استفاده در این مطالعه عبارتند از:

Shigella dysenteriae (biotype: 1, 4, 7, 8), *Shigella flexneri* (biotype 2a), *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*,

شیگاتوکسین و توکسین‌های شبیه شیگا (وروتوکسین‌ها) متعلق به خانواده بزرگی از توکسین‌های باکتریایی و گیاهی هستند که طی یک روند بیولوژیک باعث مرگ سلول‌ها می‌شوند. این توکسین‌ها ابتدا از طریق یک رسپتور گلیکولیپیدی به نام Gb3 به سطح سلول متصل شده و سپس طی پدیده اندوسیتوز وارد سلول شده و طی یک روند آنزیمی با خارج کردن یک آدنین از 28S r RNA بخش 60S ریبوزوم فرآیند سنتز پروتئین را در سلول مهار کرده و باعث مرگ سلول می‌شوند. [۱۴ و ۲۱] شیگاتوکسین (*Stx*) توسط شیگلا دیسانتری تولید می‌شود و شدت بیماری حاصل از این باکتری را افزایش می‌دهد، در حالی‌که توکسین‌های شبیه شیگا که تا اندازه‌ای با شیگا توکسین تفاوت دارند توسط نژادهایی از *E. coli* (STEC) ترشح می‌شوند [۱۱]. علاوه بر باکتری *E. coli* که قادر به تولید ورو توکسین‌ها می‌باشد، برخی از انتروباکتریاسه‌ها نیز نظیر انتروباکتر کلوکئی (*Enterobacter cloacae*)، سیتروباکتر فروندی (*Citrobacter freundii*)، آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*)، آئروموناس کاوئی (*Aeromonas caviae*) نیز قادر به تولید این توکسین‌ها هستند [۲۴ و ۲۱]. ژن‌های شیگاتوکسین در *E. coli* و نیز در شیگلاسونئی عموماً در فازهای خاص قرار دارند [۲۴، ۱۹، ۱۷ و ۱۰]. تاکنون انواع مختلفی از این توکسین از جمله: *stx*, *stx1*, *stx2f* شناسایی شده‌اند [۴، ۶، ۸، ۹، ۲۲، ۲۳، ۲۵]. باکتری‌های تولید کننده وروتوکسین مهم‌ترین عامل تولید HUS می‌باشند که اغلب در کودکان و افراد مسن مشاهده می‌شوند و حتی در کشورهای توسعه یافته مشکلات حادی را برای سلامت عمومی پدید می‌آورند، بنابراین افزایش اطلاعات پیرامون این توکسین‌ها و واکنش‌های آن‌ها با انواع سلول‌ها می‌تواند در درمان عفونت مؤثر باشد [۱۶]. تاکنون روش‌های متعددی جهت شناسایی شیگاتوکسین و یا ژن مربوط به آن شامل: Tissue culture cytotoxicity assay, PCR, ELISA, Revers passive latex agglutination, Hybridization ارائه شده است [۱۶].

کشت باکتری‌های مورد مطالعه به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ شد و رسوب (Pellet) حاصل در ۵۶۷ میکرولیتر بافر TE (10 mM Tris HCl, 10mM EDTA)، ۳۰ میکرولیتر بافر Proteinase K (20 mg/ml) SDS ۱۰٪ و ۳ میکرولیتر آنزیم حل شده و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. به مخلوط حاصل ۱۰۰ میکرولیتر نمک NaCl ۵ مولار و ۸۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl (۴/۱) گرم NaCl، ۱۰ گرم CTAB و ۸۰ میلی لیتر (DDW) اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس به مخلوط حاصل ۷۸۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ کلروفرم و ۱ ایزوآمیل الکل) اضافه و پس از تکان دادن به مدت ۲۵ دقیقه در ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. محلول رویی به تیوب دیگری منتقل گردید و هم حجم آن مخلوط فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل (۱/۲۴/۲۵) اضافه شد و پس از سانتریفوژ ۲۵ دقیقه‌ای در ۲۵۰۰ rpm، عمل ترسیب DNA به وسیله ایزوپروپانول و اتانول ۷۰ درصد در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی گراد انجام گرفت و در نهایت DNA حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (pH=8) و ۳ میکرولیتر آنزیم Rnase A حل شد [۲۰].

اندازه‌گیری غلظت DNA ژنومیک تخلیص شده: برای این منظور از دستگاه UV spectrophotometer ساخت شرکت Techne استفاده شد. برای اندازه‌گیری میزان جذب نمونه DNA ژنومیک ابتدا ژنوم به نسبت $\frac{4}{5}$ با آب مقطر رقیق شد. پس از تهیه رقت از ژنوم تخلیص شده، میزان جذب نمونه ژنومیک در طول موج ۲۶۰nm (طول موج قابل جذب برای DNA) مورد بررسی قرار گرفت. پس از اندازه‌گیری OD، غلظت DNA از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{OD} \times \text{عکس ضریب رقت} \times 50 = \text{غلظت DNA}$$

نکته: عدد ۵۰ در رابطه بالا ضریب ثابت می‌باشد و در حقیقت نشان دهنده غلظت یک نمونه DNA بر حسب ng/μl می‌باشد، زمانی که میزان جذب آن نمونه در ۲۶۰nm برابر یک باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): برای انجام فرآیند PCR، ۰/۵ میکرولیتر از DNA تخلیص شده باکتری *E. coli* O157:H7 (با غلظت ۲۱۰ ng/μl) و ۴ باکتری شیگلا دیسانتری (بیوتایپ‌های ۷، ۴، ۱ و ۸) با ۲۴/۵ میکرولیتر از دیگر اجزا واکنش PCR مخلوط

Salmonella paratyphi C, *Vibrio cholerae* (strain: ogava and inaba), *E. coli* (serotype O157:H7)

بیوتایپ ۱ شیگلادیسانتری با شناسه بین‌المللی RITCC1875 از دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و ۱۰ باکتری دیگر از آزمایشگاه رفرانس ایران تهیه گردید. جهت رشد باکتری‌ها از محیط مایع TSB و گرمادهی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت استفاده شد. جهت شناسایی گونه باکتری‌ها از روش ارایه شده توسط Collee, J.G. و همکارانش استفاده شد [۵].

پرایمرهای مورد استفاده: سه جفت پرایمر ارایه شده از طرف سایت اینترنتی بنام www.stechome.com جهت تشخیص ژن شیگاتوکسین انتخاب شد. دو جفت پرایمر جهت تکثیر قطعات *stx2*, *stx1* و یک جفت پرایمر جهت تکثیر قطعه کنترل مثبت داخلی مورد استفاده قرار گرفت که عبارتند از:

(SFI): 5-CTA-ACC-CGG-TTA-ACA-CCA-CAG-T-3'

(SRI): 5-GGA-AGA-ATG-ACA-CCA-GAG-T-3'

(Ka1F): 5-GGG-ATA-GAT-CCA-GAG-GAA-GG-3'

(Ka1R): 5-CCG-GAC-ACA-TAG-AAG-GAA-ACT-C-3'

(Ka2F): 5-CTG-GCG-TTA-ATG-GAG-TTC-AG-3'

(Ka2R): 5-CCT-GTC-GCC-AGT-TAT-CTG-AC-3'

پرایمرهای (SFI) و (SRI) قطعه‌ای به طول ۱۹۹bp را تکثیر خواهند کرد که این قطعه مربوط به ژن آنزیم مالات دهیدروژناز می‌باشد و به عنوان کنترل مثبت داخلی از آن استفاده شده است. پرایمرهای (Ka1F) و (Ka1R) قطعه‌ای به طول ۶۲۲bp را تکثیر نموده که مربوط به ژن *stx/stx1* است و پرایمرهای (Ka2F) و (Ka2R) قطعه‌ای به طول ۳۸۱bp را تکثیر نموده که مربوط به ژن *stx2* می‌باشد. برای بررسی خصوصیات این قطعات و پرایمرها از نرم افزارهای مولکولی DNASIS, BLAST, Oligo استفاده شد. پس از بررسی و تأیید خصوصیات، پرایمرها توسط دو شرکت MWG آلمان و DNA Technology AIS دانمارک ساخته شدند.

تخلیص ژنوم: برای استخراج و تخلیص DNA ژنومیک از روش CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) با کمی تغییرات استفاده شد. برای این منظور ۱/۵ میلی لیتر از محیط

Salmonella paratyphi C, *Vibrio cholerae* (strain: ogava and inaba).

پس از انجام واکنش محصول با ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. تعیین میزان حساسیت واکنش PCR: میزان حساسیت واکنش طراحی شده هم براساس میزان ژنوم تخلیص شده و هم براساس تعداد باکتری محاسبه گردید. برای این منظور ژنوم باکتری *E. coli* O157:H7 با غلظت ۲۱۰ ng/μl تا رقت ۱۰^{-۹} توسط بافر TE (pH=8) رقیق شد و برای تمامی رقت‌ها واکنش PCR انجام شده و محصول واکنش توسط ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید.

برای محاسبه حساسیت واکنش بر اساس تعداد باکتری، پس از کشت باکتری در محیط LB و اندازه‌گیری OD محیط کشت، ابتدا از محیط مورد نظر تا ۱۰^{-۱۰} رقت تهیه کرده و برای تمامی رقت‌ها واکنش PCR انجام شد و جهت محاسبه تعداد باکتری در هر رقت فرآیند شمارش باکتری (Colony count) انجام گرفت [۲۷].

نتایج

اندازه‌گیری غلظت DNA ژنومیک تخلیص شده: پس از تخلیص DNA ژنومیک باکتری *E. coli* O157:H7 میزان جذب نوری آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که حاصل آن عدد ۰/۳۳۶ بود و غلظت نهایی نمونه بر حسب ng/μl به صورت زیر محاسبه شد:

$$50 \times \frac{0.336}{4} \times 0.336 = 210 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

واکنش PCR با DNA ژنومیک تخلیص شده: پس از اتمام واکنش PCR با محصول ژنومیک ۵ باکتری شیگلا و *E. coli* و الکتروفورز آن‌ها توسط ژل آگارز ۲ درصد نتیجه واکنش مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱).

همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، هر سه قطعه مربوط به همان گونه که در مورد *E. coli* O157:H7، *stx2*، *stx/stx1* (ستون ۲) و در مورد گونه شیگلادیسانتتری تنها قطعه *stx/stx1* و Control در بیوتایپ ۱ این باکتری تکثیر شده (ستون ۶) و در سه بیوتایپ ۴، ۷، ۸ تنها قطعه Control تکثیر شده است که تکثیر قطعه کنترل دلیلی بر صحت انجام واکنش می‌باشد

شد. این اجزا عبارتند از: ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها با غلظت ۵ pmol/μl (در مجموع ۶ میکرولیتر)،

۱ میکرولیتر از مخلوط dNTP با غلظت ۲/۵، ۳/۸ میکرولیتر MgCl₂ با غلظت ۱۰۰ mM، ۲/۵ میکرولیتر از ۱۰× PCR buffer، ۱۰/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل (DDW) و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase (5unit/μl). برنامه PCR شامل یک مرحله واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۲۰ چرخه تکثیر DNA (۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه) و یک مرحله نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام واکنش ۵ میکرولیتر از محصولات واکنش به همراه یک میکرولیتر محلول رنگ زا (Loading buffer) توسط ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۲۰ دقیقه تحت تاثیر ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد.

تایید محصولات واکنش: برای این منظور هم از هضم آنزیمی محصولات واکنش توسط آنزیم‌های محدود کننده و هم تعیین توالی استفاده شد. پس از بررسی توالی سه قطعه مورد انتظار توسط نرم افزار DNASIS سه آنزیم Hind III برای هضم قطعه *stx/stx1* Hae III برای هضم قطعه *stx2* و EcoR V برای هضم قطعه کنترل داخلی در نظر گرفته شدند. پس از تکثیر هر یک از قطعات به صورت مجزا، ۶ میکرولیتر از آن‌ها توسط ۱ میکرولیتر از آنزیم مربوطه به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفت و محصول هضم آنزیمی توسط ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفورز شد.

به منظور تعیین توالی، ابتدا ۵۰ میکرولیتر از هر یک از قطعات تکثیر شده توسط کیت تخلیص محصول PCR شرکت Fermentas تخلیص شد و فرآیند تعیین توالی توسط شرکت MWG آلمان انجام گرفت.

تعیین میزان اختصاصی بودن واکنش PCR: برای این منظور، واکنش PCR با ژنوم تخلیص شده از ۱۰ باکتری خانواده انتروباکتریاسه انجام شد. این باکتری‌ها عبارتند از:

Shigella dysenteriae (biotype: 1, 4, 7, 8), *Shigella flexneri* (biotype 2a), *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*,

تایید محصولات PCR: پس از بررسی قطعات تکثیر شده توسط نرم افزار DNASIS، سه آنزیم Hind III، Hae III و EcoR V جهت هضم این قطعات در نظر گرفته شد که پس از انجام هضم آنزیمی بر روی هر یک از قطعات نتایج حاصل از آن در شکل ۳ مشاهده می‌شود.



شکل ۴: تعیین specificity واکنش PCR

۱- E.coli 0157:H7 (به عنوان مارکر و کنترل مثبت)، ۲- شیگلا دیسانتری (بیوتاایپ ۴)، ۳- شیگلا دیسانتری (بیوتاایپ ۷)، ۴- شیگلا دیسانتری (بیوتاایپ ۸)، ۵- شیگلا فلکسنری (بیوتاایپ 2a)، ۶- شیگلا سونئی، ۷- شیگلا بوئیدی، ۸- ویبریو کلرا (سروتیپ اگاوا)، ۹- ویبریو کلرا (سروتیپ اینابا)، ۱۰- سالمونا پاراتیفی C.

در ستون ۷-۲ تنها قطعه mdh تولید شده است. این باکتری‌ها قادر به تولید توکسین نمی‌باشند. سه باکتری دیگر نیز علاوه بر عدم تولید توکسین فاقد قطعه mdh می‌باشند. وجود باند اضافی در زیر قطعه ۱۹۹bp مربوط به پرایمرها و dNTP استفاده نشده در واکنش می‌باشد.

آنزیم Hind III قطعه *stx1* را در جایگاه ۳۳۵ مورد برش قرار داده که در نتیجه این فرایند دو قطعه ۲۸۷ bp و ۳۳۵ bp ایجاد شده است (ستون ۲). آنزیم Hae III نیز قطعه *stx2* را در جایگاه ۲۸۸ برش داده که دو قطعه ۹۳ bp و ۲۸۸ bp ایجاد شده است (ستون ۳) و آنزیم EcoR V نیز قطعه کنترل را در جایگاه ۹۶ مورد برش قرار داده که دو قطعه ۹۶ bp و ۱۰۳ bp ایجاد شده است و این دو قطعه به دلیل این که تقریباً هم اندازه هستند در ژل آگارز به صورت یک باند واحد مشاهده می‌شوند (ستون ۴).

تعیین توالی قطعات تکثیر شده و مقایسه نتایج حاصل از آن با توالی قطعات که از بانک ژنوم استخراج شده بود صحت قطعات تکثیر شده را تایید کرد. توالی این قطعات به صورت زیر می‌باشد:

stx/stx1 PCR product: (622 bp)
 gggatagatccagaggaaggcggtttaataatctacggcttattgttgaa
 cgaaataatttatgtgacaggatttgaacaggacaataatgtttttato

(ستون ۵-۳). اندازه دقیق قطعات مورد نظر در شکل ۲ قابل مشاهده می‌باشد که در آن محصول واکنش PCR با ژنوم *E. coli* O157:H7 به همراه مارکر ۱۰۰bp الکتروفورز شده است.



شکل ۱: واکنش PCR با محصول ژنومیک.

۱- Size marker (pUC18-Taql) *E. coli* O157:H7-۲. تولید هر سه قطعه در این باکتری نشان‌دهنده این است که باکتری قادر به تولید هر دو نوع شیگاتوکسین می‌باشد، ۳- شیگلا دیسانتری (بیوتاایپ ۴)، ۴- شیگلا دیسانتری (بیوتاایپ ۷)، ۵- شیگلا دیسانتری (بیوتاایپ ۸)، ۶- شیگلا دیسانتری (بیوتاایپ ۱) (تولید قطعه ۶۲۲bp در این باکتری نشان‌دهنده این است که باکتری تنها قادر به تولید Stx/Stx1 می‌باشد).



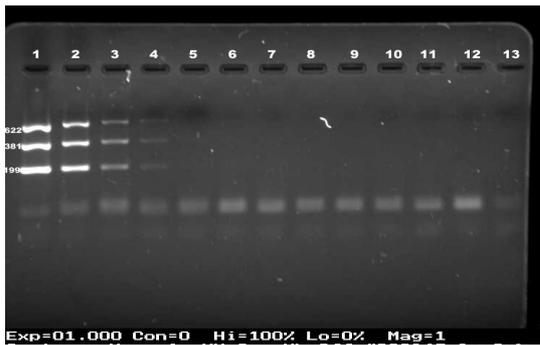
شکل ۲: واکنش PCR با محصول ژنومیک

۱- Size marker (100bp) *E. coli* O157:H7. اندازه دقیق هر سه قطعه مورد نظر در این شکل قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۳: برش آنزیمی محصولات PCR

۱- Size marker، ۲- قطعات حاصل از برش آنزیمی Stx1، ۳- قطعات حاصل از برش آنزیمی Stx2، ۴- قطعات حاصل از برش آنزیمی Control. با توجه به نزدیک بودن اندازه‌ها، دو قطعه به صورت یک باند مشاهده می‌شوند.



شکل ۶: تعیین حساسیت بر حسب تعداد باکتری
 ۱- مارکر، ۲- رقت 10^{-1} ، ۳- رقت 10^{-2} ، ۴- رقت 10^{-3} ، ۵- رقت 10^{-4} : تعداد باکتری در این رقت $320 \text{ cfu}/\mu\text{l}$ می باشد، ۶- رقت 10^{-5} ، ۷- رقت 10^{-6} ، ۸- رقت 10^{-7} ، ۹- رقت 10^{-8} ، ۱۰- رقت 10^{-9} ، ۱۱- رقت 10^{-10}

میزان اختصاصی بودن واکنش PCR: نتیجه حاصل از انجام واکنش PCR با ۹ باکتری دیگر از خانواده انتروباکتریاسه در شکل ۴ مشاهده می شود. همان گونه که در شکل مشاهده می شود سه قطعه مورد نظر تنها در *E. coli* O157:H7 تکثیر شده اند (ستون ۱) و در مورد ۹ باکتری دیگر، تنها در مورد ۶ نمونه اول که از جنس شیگلا هستند قطعه کنترل تکثیر شده است (ستون ۷-۲) و در مورد سه باکتری دیگر این قطعه نیز تکثیر نشده است (ستون ۱۰-۸).

میزان حساسیت واکنش PCR: پس از تهیه رقت از ژنوم *E. coli* O157:H7 با غلظت $210 \text{ ng}/\mu\text{l}$ و انجام واکنش برای هر یک از رقت ها نتیجه حاصل از واکنش در شکل ۵ مشاهده می شود. همان گونه که در شکل مشاهده می شود، واکنش تا رقت 10^{-5} از DNA ژنومیک انجام شده است (ستون ۶). با توجه به این که غلظت DNA ژنومیک در نمونه اولیه $210 \text{ ng}/\mu\text{l}$ بوده است، حساسیت واکنش برابر با $2/1 \text{ pg}/\mu\text{l}$ خواهد بود. پس از تهیه رقت از کشت باکتری در محیط LB و انجام واکنش برای هر یک از رقت ها نتیجه حاصل از آن در شکل ۶ مشاهده می شود. همان گونه که در شکل مشاهده می شود تکثیر قطعه مورد نظر تا رقت 10^{-3} از محیط کشت باکتری انجام شده است (ستون ۴) که در این رقت تعداد باکتری برابر $320 \text{ cfu}/\mu\text{l}$ می باشد، که نشان دهنده حساسیت واکنش بر حسب تعداد باکتری می باشد.

gctttgctgattttcacatgttacctttccaggtaacaacagcgggtacattgtc
 tggtagacagtagctataccacgttacagcgtgttcagggaatgctgtac
 ggggatgcagataaatgccattcgttgactactcttatctggattfaatgte
 gcatagtggaaacctoactgacgcagctgtggcaagagc gatgttacgggt
 tgttactgtgacagctgaagctttacgttttcggcaatacagaggggatttc
 gtacaacactgggatctcagtgggcgttcttatgtaatgactgctgaaga
 tgttgatottacattgaactggggaaggttgagtagyctctgctgactat
 catggacaagactctgttegtgttaggaagaattctttggaagcattaatgc
 aattctgggaagcgtggcattaactgaattgtoatcateatgcatcgca
 gttgccagaatggcatctgatgagtttcttctatgtgtccgg

stx2 PCR product: (381 bp)

ctggcgtaatggagttcagtggttaatacaatgaccagagatgcatcagaga
 gcagttctgcgtttgtcactgtcacagcagaagccttacgcttcaggcaga
 tacagagagaatttcgtaggcactgtctgaaactgctcctgtgtatacgt
 gacgccgggagacgtggacctoacttgaactggggcgcaatcagcaat
 gtgctccggagtatcggggagaggtggtgtcagagtggggagaatatac
 cttaataatataoagcgatactggggactgtggccgttatactgaattgcc
 atcatcagggggcgctgtotgttcgcccgtgaatgaagagagtgcaacca
 gaatgcatagataactggcgacagg

mdh (Internal positive control) PCR product: (199 bp)

ctaaccgggtaaacaccacagttgcgattgctgctgaagtgtgaaaaaag
 ccggtgttatgacaaaaaacaagtgttcgctgtaccacgctggatatcat
 tcgttcaaacactttgttgcggaactgaaggcaaacagccaggcgaagt
 tgaagtgccggttattggcggtcactotggtgttaccattotgcc



شکل ۵: تعیین حساسیت بر حسب میزان غلظت DNA ژنومیک
 ۱- مارکر، ۲- رقت 10^{-1} ، ۳- رقت 10^{-2} ، ۴- رقت 10^{-3} ، ۵- رقت 10^{-4} ، ۶- رقت 10^{-5} : غلظت DNA در این رقت $2/1 \text{ pg}/\mu\text{l}$ می باشد
 ۷- رقت 10^{-6} ، ۸- رقت 10^{-7} ، ۹- رقت 10^{-8} ، ۱۰- رقت 10^{-9}

بحث

شیگاتوکسین یکی از عوامل حدت‌زای تولید شده توسط شیگلا و *E. coli* می‌باشد که برای اولین بار در بیوتایپ ۱ شیگلا دیسانتری مورد شناسایی قرار گرفت که علاوه بر اثرات مخرب بر دستگاه گوارش خصوصاً روده از طریق خون به سیستم عصبی مرکزی نیز انتقال یافته و اثرات مخربی را بر روی این دستگاه وارد می‌کند [۱۵]. محققین این توکسین‌ها را به دو دسته عمده تقسیم می‌کنند: شیگاتوکسین یا Stx که ژن آن *stx* نام دارد و منبع آن بیوتایپ ۱ شیگلا دیسانتری می‌باشد و توکسین شبیه شیگا یا Shiga like toxin یا SLT که خود به دو گروه Stx1 و Stx2 تقسیم می‌شود و اغلب زیرگونه‌های بیماری‌زای *E. coli* مانند *E. coli* 0157:H7 آنرا تولید می‌کنند [۱۶].

تاکنون روش‌های متعددی جهت شناسایی شیگاتوکسین و یا ژن مربوط به آن ارایه شده است. در روش تشخیص این توکسین به‌وسیله کشت سلولی از سلول‌هایی که دارای گیرنده اختصاصی برای این توکسین هستند استفاده شده است [۱۶ و ۱۷]. اما این روش علی‌رغم حساسیت بسیار بالایی که در شناسایی توکسین دارد، دارای معایبی از جمله نیاز به زمان طولانی، صرف هزینه و زمان طولانی جهت فراهم کردن سلول‌های اختصاصی و طولانی بودن مدت زمان دریافت پاسخ آزمایش می‌باشد، ضمن این‌که انجام این آزمایش نیازمند فضای ویژه‌ای است که نمی‌توان آن را در تمامی آزمایشگاه‌ها فراهم کرد. در روش الایزا از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال جهت شناسایی توکسین استفاده می‌گردد [۱۶]. این روش نیز دارای حساسیت و سرعت بسیار بالایی است و انجام آن نیز تقریباً در هر آزمایشگاهی امکان‌پذیر می‌باشد، اما دارای محدودیت‌هایی از جمله عدم تفکیک بین انواع شیگاتوکسین و نیاز به آنتی‌بادی مونوکلونال ضدتوکسین می‌باشد، که تهیه و استفاده از آن به عنوان کیت آزمایشگاهی نیاز به صرف هزینه و زمان زیادی دارد. در روش RPLA نیز از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال متصل به ذرات لاتکس استفاده می‌شود [۱۶]. این روش نیز از حساسیت بالایی در شناسایی توکسین و یا عامل مولد آن برخوردار است اما نیاز به آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و زمان طولانی جهت تشخیص، آن را محدود می‌کند. روش دورگه سازی یک تکنیک مولکولی موثر و بسیار حساس در شناسایی دقیق و اختصاصی عوامل بیولوژیک بر پایه ساختار ژنتیکی آن‌ها می‌باشد. این تکنیک به‌طور موثری در شناسایی ژن انواع شیگاتوکسین استفاده شده است [۲].

۱۱ و ۱۶] و هنوز نیز از آن به‌عنوان یک عامل مکمل در روش‌های مولکولی جهت تایید محصولات PCR استفاده می‌شود، اما این روش نیز علی‌رغم حساسیت و دقت فراوان دارای محدودیت‌هایی از جمله، خطرات ناشی از پروب‌های رادیواکتیو مورد استفاده در روش‌های اولیه آن، پیچیدگی، نیاز به زمان طولانی و عدم کارایی آن در مورد تعداد زیاد نمونه‌های بالینی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی می‌باشد. اگرچه در حال حاضر با استفاده از پروب‌های نشان‌دار شده با DIG خطرات ناشی از مواد رادیواکتیو کاهش یافته است [۱۱].

تکنیک PCR که امروزه از آن به‌طور وسیعی در مهندسی ژنتیک و تشخیص طیف گسترده‌ای از عوامل بیولوژیک استفاده می‌شود یک روش بسیار اختصاصی و در عین حال حساس برای شناسایی انواع ژن‌ها و عوامل بیولوژیک می‌باشد. این تکنیک ضمن سادگی، محدودیت‌های روش‌های فوق‌الذکر را ندارد و می‌توان از آن به‌طور گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی جهت شناسایی عوامل بیماری‌زا استفاده نمود. از این تکنیک اولین بار در سال ۱۹۸۹ جهت شناسایی ژن شیگاتوکسین استفاده شد [۱۲]. در این مطالعه از یک جفت پرایمر جهت شناسایی ژن شیگاتوکسین استفاده شده است. روش ارایه شده در آن سال دارای معایبی بود که شامل پایین بودن T_m و عدم کارایی آن در شناسایی انواع شیگاتوکسین بود زیرا پس از سال ۱۹۸۹ چند نوع ژن شیگاتوکسین مورد شناسایی قرار گرفت که از نظر توالی با یکدیگر متفاوت می‌باشند. با توجه به مواردی که ذکر شد جهت شناسایی انواع شیگاتوکسین طراحی یک واکنش Multiplex PCR که در آن حداقل از دو جفت پرایمر جهت شناسایی ژن شیگاتوکسین استفاده شود مد نظر قرار گرفت.

پرایمرهای ارایه شده توسط T. A. Cebula و همکاران [۳] جهت شناسایی هر دو نوع ژن مناسب می‌باشند. ضمن این‌که وجود یک قطعه کنترل مثبت داخلی می‌تواند به افزایش دقت و صحت انجام واکنش کمک فراوانی کند. اما این پرایمرها تنها قادر به شناسایی ژن توکسین در *E. coli* O157:H7 می‌باشند. پرایمرهای ارایه شده توسط A. W. Paton و همکارش [۱۵] نیز جهت شناسایی هر دو نوع توکسین مناسب می‌باشند، اما اندازه قطعات تولید شده کوچک بوده و جهت تفکیک آن‌ها بر روی ژل آگارز باید مدت زمان زیادی صرف کرد. ضمن این‌که جهت تعیین گونه باکتری باید از واکنش دیگری استفاده نمود، چرا که اندازه

انجام شده $100 \text{ pg}/\mu\text{l}$ می باشد. S. M. Frank و همکاران [۷] نیز از حرارت دادن باکتری در دمای 100 درجه سانتی‌گراد جهت تخلیص ژنوم استفاده کرده‌اند که با این روش نیز مهار کنندگان واکنش حذف نخواهند شد. در تحقیق ارایه شده با استفاده از ماده‌ای به نام CTAB به همراه NaCl غلیظ (5M) این مهار کننده‌ها به‌طور مؤثرتری از DNA جدا شده‌اند که حاصل این فرآیند افزایش حساسیت واکنش تا حد $2/1 \text{ pg}/\mu\text{l}$ از ژنوم تخلیص شده می‌باشد. حساسیت واکنش بر حسب تعداد باکتری $320 \text{ cfu}/\mu\text{l}$ می‌باشد که حدود سه برابر حساسیت واکنش ارایه شده توسط A. Paton و همکارش $1000 \text{ cfu}/\mu\text{l}$ می‌باشد. [۱۵]

واکنش PCR اولیه با DNA ژنومیک استخراج شده از شیگلا دیسانتری (بیوتا‌یپ ۱) و *E. coli* O157:H7 با موفقیت انجام گرفت. در مورد *E. coli* هر دو باند *stx1*، *stx2* مشاهده شدند که این مسأله نشان دهنده این است که باکتری قادر است هر دو نوع توکسین را تولید نماید. در مورد بیوتا‌یپ ۱ شیگلا دیسانتری نیز تنها قطعه 622 bp تکثیر شده که این مسأله نیز با مقدماتی که در مورد باکتری بیان شد مطابقت دارد ضمن این که وجود قطعه کنترل داخلی دلیل قاطعی بر صحت انجام واکنش و نوع باکتری مورد استفاده می‌باشد.

با توجه به مواردی که ذکر شد می‌توان نتیجه گرفت که واکنش طراحی شده چه از نظر حساسیت و چه از نظر اختصاصی بودن قابلیت شناسایی انواع ژن شیگاتوکسین را با موفقیت دارا است و می‌توان از این واکنش در شناسایی عوامل تولید کننده شیگاتوکسین در نمونه‌های بالینی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از تمامی اساتید، همکاران و دوستان در دانشگاه امام حسین^(ع)، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الاعظم^(عج) و آزمایشگاه رفرانس ایران که در به نتیجه رسیدن این تحقیق تلاش فراوان کردند، کمال تشکر را می‌نماییم.

قطعه کنترل مربوط به *E. coli* O157:H7 تنها 4 bp با قطعه *stx2* تفاوت دارد و نمی‌توان محصولات واکنش را از هم تفکیک نمود. پرایمرهای ارایه شده توسط M. A. Pass و همکاران [۱۳] نیز قادر به شناسایی دو نوع توکسین می‌باشند اما قطعات حاصل به راحتی روی ژل آگارز از هم تفکیک نمی‌شوند و جهت شناسایی *stx2e* نیز باید از یک جفت پرایمر دیگر استفاده نمود. پرایمرهای ارایه شده توسط S. D. Belanger و همکاران [۱] نیز توانایی تفکیک دو نوع توکسین را دارا هستند اما به علت این که قطعات تکثیر شده از نظر اندازه به یکدیگر نزدیک هستند در نتیجه تفکیک آن‌ها بر روی ژل آگارز مشکل خواهد بود. یک جفت پرایمر ارایه شده توسط D. Philpot و همکاران [۱۶] نیز برای جستجوی شیگاتوکسین در یک نمونه مناسب می‌باشد اما توانایی تفکیک بین انواع آن را دارا نمی‌باشند.

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه تقریباً شرایط لازم جهت شناسایی دو نوع توکسین را دارا می‌باشند چرا که با بررسی‌های انجام شده و اطلاعات موجود در بانک ژنوم مشخص شد که این پرایمرها قادر به تکثیر انواع ژن شیگاتوکسین می‌باشند، ضمن این که اندازه قطعات جهت تفکیک و هضم آنزیمی مناسب می‌باشند. در ضمن وجود قطعه کنترل مثبت داخلی که مربوط به ژن مالات دهیدراز (*mdh*) می‌باشد نیز می‌تواند در اثبات صحت نتیجه آزمایش بسیار موثر باشد. با انجام واکنش PCR مشخص شد که ژن شیگاتوکسین علاوه بر *E. coli* در چهار گونه شیگلا نیز موجود می‌باشد و از این نظر وجود این قطعه می‌تواند دلیلی بر وجود باکتری *E. coli* و شیگلا در یک نمونه باشد.

همان‌طور که می‌دانیم باکتری‌های گرم منفی و خصوصاً انتروباکتریاسه‌ها دارای دیواره سلولی با ساختمان بسیار پیچیده‌ای می‌باشند که ترکیبی از انواع لیپیدها، هیدرات‌های کربن و پروتئین می‌باشد. وجود چنین موادی در واکنش PCR می‌تواند به عنوان مهار کننده واکنش عمل نماید و موجب کاهش حساسیت واکنش گردد. جهت حذف چنین موادی باید DNA موجود در باکتری قبل از استفاده در واکنش تخلیص گردد. D. R. Pollard و همکاران [۱۸]، M. P. Jackson و همکاران [۱۱] و G. Wang و همکاران [۲۶] از Tris، SDS-lysozyme، گلوکز و EDTA جهت تخلیص DNA باکتری استفاده کرده‌اند و حساسیت واکنش

منابع

- 1- Belanger SD, Boissinot M, Menard C, Picard FJ, Bergeron GM. Rapid detection of shiga toxin-producing bacteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the smart cycler. *J Clin Microb* 2002;40:1436-1440.
 - 2- Brown JE, Sethabutr O, Jackson MP, Lolekha S, Echeverria P. Hybridization of *Escherichia coli* producing Shiga-like toxin I, Shiga-like toxin II, and a variant of Shiga-like toxin II with synthetic oligonucleotide probes. *Infect Immun* 1989;57:2811-2814.
 - 3- Cebula TA, Payne WL, Feng P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype 0157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microb* 1995;33: 248-250.
 - 4- Gobius KS, Higgs GM, Desmarchelier PM. Presence of activable shiga toxin genotype (Stx2d) in shigatoxigenic *Escherichia coli* from livestock sources. *J Clin Microb* 2003;41:3777-3783.
 - 5- Collee JG, Duguid JP, Fraser AG, Marmion BP. *Practical Medical Microbiology*. 13th ed. London: Churchill Livingstone; 1989.p.100-320.
 - 6- DE Grandis S, Ginsberg J, Toone M, Climie S, Friesen J, Brunton J. Nucleotide sequence and promoter mapping of the *Escherichia coli* shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B. *J Bacteriol* 1987;169:4313-4319.
 - 7- Franck SM, Bosworth BT, Moon HW. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. *J Clin Microb* 1998;36:1795-1797.
 - 8- Friedrich AW, Borell J, Bielaszewska M, Fruth A, Tschape H, Karch H. Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: Phenotypic and genetic characterization and association with human disease. *J Clin Microb* 2003;41:2448-2453.
 - 9- Gannon VPJ, Teerling C, Masri SA, Gyles CL. Molecular cloning and nucleotide sequence of another variant of the *Escherichia coli* shiga-like toxin II family. *J Gen Microb* 1990;136:1125-1135.
 - 10- Huang A, Friesen J, Brunton JL. Characterization of bacteriophage that carries the genes for production of shiga-like toxin I in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1987;169:4308-4312.
 - 11- Jackson MP. Detection of shiga toxin-producing *Shigella dysenteriae* type 1 and *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction with incorporation of Digoxigenin-11-dUTP. *J Clin Microb* 1991;29:1910-1914.
 - 12- Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microb* 1989;27:2751-2757.
 - 13- Pass MA, Odedra R, Batt RM. Multiplex PCR for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microb* 2000;38:2001-2004.
 - 14- Paton AW, Paton JC. Pathogenesis and diagnosis of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin Microb Rev* 1998;1: 450-479.
 - 15- Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of shigatoxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eae A, enterohemorrhagic *Escherichia coli* hly A, rfb 0111, and rfb 0157. *J Clin Microb* 1998;36:598,602.
 - 16- Philpot D, Ebel F. *E.coli*, Shiga toxin Methods and protocols. New Jersey: Humona Press; 2003.p.1-150.
 - 17- Plunkett III G, Rose DJ, Durfee TJ, Blattner FR. Sequence of shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* 0157:H7: shiga toxin as a phage Late-gene product. *J Bacter* 1999;181:1767-1778.
 - 18- Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD, Rozee KR. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microb* 1990;28:540-545.
 - 19- Rietra PJGM, Willshaw GA, Smith HR, Field AM, Scotland SM, Rowe B. Comparison of vero-cytotoxin-encoding phages from *Escherichia coli* of human and bovin origin. *J Gen Microb* 1989;135:2307-2318.
 - 20- Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning, A laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Coldspring Harbor Laboratory Press; 2001.p.6.61-6.62.
 - 21- Sandvig K. Shiga toxins. *Toxicon* 2001;39:1629-1635.
 - 22- Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Kawch H. A new shiga toxin 2 variant (stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microb* 2000;66:1205-1208.
 - 23- Schmitt CK, Mckee ML, O'Brien AD. Two copies of shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the 0157:H⁻ strain E32511. *Infect Immun* 1991;59:1065-1073.
 - 24- Strauch E, Lurz R, Beutin L. Characterization of a shiga toxin-encoding temperate bacteriophage of *Shigella sonnei*. *Infect Immun* 2001;69:7588-7595.
 - 25- Strockbine NA, Jackson MP, Sung LM, Holmes RH, O'Brien AD. Cloning and sequencing of the genes for shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type 1. *J Bacter* 1988;170:1116-1122.
 - 26- Wang G, Clark GC, Rodgers FG. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the 0157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microb* 2002;40:3913-3619.
- ۲۷- امیر همایون کیهان. شناسایی ژن شیگاتوکسین به وسیله روش Multiplex PCR. [پایان نامه کارشناسی ارشد] تهران: دانشکده علوم پایه دانشگاه امام حسین (ع)؛ ۱۳۸۳.