

بیان ژن *ompF* در موتان‌های *E. coli* مقاوم به سپروفلوکسازین و تتراسیکلین

Expression of *ompF* gene in *E. coli* mutants resistant to ciprofloxacin and tetracycline

فهیمه حیدری^۱، راضیه پوراحمد^{*۱}، بهزاد شارقی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، دانشگاه شهرکرد، ایران

Heidari F¹, Pourahmad R^{*1}, Shareghi B¹

۱. MSc Student, Assistant professor, Associate professor, University of Shahrekord, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Razieh_Jaktaji@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۹ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۲۳)

چکیده

OmpF یکی از پروتئین‌های غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که جذب فلوروکیانولون‌هایی مانند سپروفلوکسازین به داخل سلول باکتری‌ای را تسهیل می‌کند. بنابراین تنظیم بیان ژن *ompF* به عنوان یک مکانیسم موثر در مقاومت ضد میکروبی است. هدف این تحقیق سنجش بیان ژن *ompF* در موتان‌های *gyrA* و موتان‌های *gyrA marR* مصانع MIC در موتان‌های *ompF* بود. بیان ژن *ompF* در موتان‌های فوق با PCR با روش MG1655 با تیپ وحشی *E. coli* و متوسط برای سپروفلوکسازین و تتراسیکلین در مقایسه با تیپ وحشی *E. coli* در زمان واقعی سنجش شد. نتایج حاصل از واکنش PCR در زمان واقعی، اختلاف معنی‌داری را بین میزان بیان *ompF* در موتان‌ها و تیپ وحشی نشان نداد. مقاومت پایین و متوسط به سپروفلوکسازین و تتراسیکلین در موتان‌های بررسی شده باعث کاهش بیان ژن *ompF* نشد.

واژه‌های کلیدی

مقاومت چند دارویی

موتان *gyrA marR*

E. coli

ompF

QPCR

یافتن ژن *ompF* در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *E. coli* قبل از کارش شده است (Kishii and Takei 2009).

هدف این تحقیق بررسی میزان بیان ژن *ompF* در نمونه‌های موتان *gyrA* و موتان مضاعف *marR* مقاوم به سیپروفلوکسازین و تتراسیکلین در مقایسه با نمونه‌های تیپ وحشی، با روش PCR در زمان واقعی^۴ بود.

در این تحقیق از موتان‌های *gyrA* با مقاومت پایین به سیپروفلوکسازین شامل سه موتان W26، W25 و W49 استفاده شد (Pourahmad and Mohiti 2010; Pourahmad et al. 2012). Pourahmad همچنین کلون‌های حاصل از آنها RE6 و RE16 (and Ebadi 2013) نیز مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). براساس تقسیم‌بندی از پیش تعریف شده، این کلون‌ها جزو انواع با مقاومت متوسط به سیپروفلوکسازین و تتراسیکلین هستند (George and Levy 1983; Kishii and Takei 2009). سویه MG1655 به عنوان سویه کنترل مورد استفاده قرار گرفت. از محیط LB مایع حاوی ۵ µg/ml تتراسیکلین جهت کشت موتان‌ها استفاده شد، پس از اینکه OD نمونه‌ها در طول موج ۶۵۰ نانومتر برابر ۰/۶ شد، برای استخراج RNA استفاده شدند. از محلول محافظه RNA^۵ کیت RNA Protect Bacteria Kit^۶ برای RNeasy Protect Bacteria Kit^۷ کیت RNA استخراج شد. جلوگیری از تخریب سریع RNA طبق دستورالعمل آن استفاده شد. سپس مطابق دستورالعمل کیت RNeasy mini Kit (کیاژن) استخراج RNA انجام شد. جهت حذف آلودگی‌های DNA کروموزومی فرایند تیمار DNase طبق دستورالعمل کیت فرمتاز (DNase I, RNase- free) (روی نمونه RNA استخراج شده انجام شد. برای این منظور از یک میکرولیتر آنزیم و بافر X ۱۰ بازی یک میکروگرم RNA در حجم نهایی ده میکرولیتر از آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. از واکنش PCR جهت تکثیر یک ژن ضروری *rpsL* و برای بررسی صحت فرایند تیمار DNase و اطمینان از عدم آلودگی به DNA در نمونه حاوی RNA استفاده شد جذب و غلظت RNA و میزان خلوص آن در هر یک از نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Visible در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شد.

⁴ Real-time PCR

⁵ RNA protect bacteria reagent

باکتری‌ها ممکن است مقاومت به داروهای ضد باکتریایی را از طریق مکانیسم‌های متنوعی نظیر تغییر پروتئین هدف عامل ضد باکتریایی (مانند تغییر در زیر واحد GyrA آنزیم DNA جیزار)، کاهش بیان یا تغییر در کanal پروتئینی خارج سلولی وارد کننده دارو به سلول (مانند OmpF در *E. coli*) و افزایش بیان پمپ‌های خارج کننده دارو از سلول (مانند پمپ AcrAB-TolC در *E. coli*) (Ruiz 2003).

سیپروفلوکسازین^۸ یکی از انواع فلوروکینولون‌ها، است که فعالیت گسترده‌ای در مقابل باکتری‌های گرم منفی نظیر *E. coli* دارد (Ruiz 2003). یکی از اهداف سیپروفلوکسازین در سلول باکتری آنزیم DNA جیزار (توبوایزومراز II) است. اتصال این آنتی‌بیوتیک به آنزیم DNA جیزار متصل به DNA باعث مهار فعالیت آنزیم می‌شود. موتاسیون در زیراحده‌ای جیزار ظاهرا میل ترکیبی آن به فلوروکینولون‌ها را کاهش و یا از بین می‌برد (Barnard and Maxwell 2001). پورین OmpF کanal پروتئینی غیر اختصاصی می‌باشد که ورود مواد غذایی و آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند فلوروکینولون‌ها را به درون سلول تسهیل می‌کند. *micF* ژن کد کننده یک RNA آنتی‌سنس است که در *E. coli* و باکتری‌های خویشاوند آن یافت می‌شود و بیان *ompF* را پس از رونویسی، هنگام مواجه شدن با تنش‌های محیطی، کنترل می‌کند (Frost and Delihas 2001). اپرون MarR در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند، کلرامفینیکل^۹، فلوروکینولون‌ها و تتراسیکلین^{۱۰} نقش دارد. این اپرون، یک مهارکننده به نام Mar و یک فعال کننده رونویسی به نام MarA را کد می‌کند (Alekshun et al. 1997). طی دو مسیر از اتصال MarR به اپراتور *marO* جلوگیری می‌شود. اولین مسیر وقوع موتاسیون‌های غیر فعال کننده در *marR* و دومین مسیر در معرض قرارگیری باکتری با ترکیبات متنوع نظیر کلرامفینیکل و تتراسیکلین است که باعث مهار فعالیت MarR می‌شود (Cohen et al. 1993; Seone et al. 1995). MarA مانع ورود ترکیبات سمی، از طریق بیش بیان *micF* و به عبارتی کاهش غیر مستقیم پورین OmpF (به واسطه *micF*) می‌شود. تاثیر کاهش

⁸ Ciprofloxacin

⁹ Chloramphenicol

¹⁰ Tetracycline

جدول ۱- مشخصات فنوتیپی و ژنتیکی سویه کنترل و موتان‌ها.

نام موتان	سویه / موتان / کلون	MIC سپروفلوکسازین (ng/ml)	MIC تتراسیکلین (μg/ml)	MIC کلرامفینیکل (μg/ml)	ژنتیکی خصوصیات
MG1655		۳۵	۳	۴	تیپ وحشی
W25		۷۵	۴	۵	موتان جدا شده از تیپ وحشی دارای موتابسیون در <i>GyrA</i> (Ser ₈₃ →Leu) و <i>MarR</i> (Met ₇₄ →Thr)
W26		۷۵	۴	۵	موتان جدا شده از تیپ وحشی دارای موتابسیون در <i>GyrA</i> (Ser ₈₃ →Leu)
W49		۶۲۵	۵	۵	موتان جدا شده از تیپ وحشی دارای موتابسیون در <i>GyrA</i> (Ser ₈₃ →Leu) و <i>marO</i> تکرار ۲۰ جفت بازی در اپراتور
RE6		۱۰۰	۴۵	۴۵	کلون حاصل از W25 با همان موتابسیونها
RE16		۱۰۰	۳۰	۴۰	کلون حاصل از W49 با همان موتابسیونها

جدول ۲- ویژگی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR در زمان واقعی.

نوع آغازگر	ترتیب توالی (۵' - ۳')	اندازه محصول (جفت باز)	ژن
رفت (F)	ACTTACGAGCAGATCAAAGC	۱۷۰	<i>gapA</i>
	AGTTTCACGAAGTTGTCGTT		
برگشت (R)	CGTACTTCAGACCAGTAGCC	۲۰۹	<i>ompF</i>
	GAACCTCGCTGTTCAAGTACC		

فلورسنس محصولات از یک حد آستانه بیشتر می‌شود. تجزیه آماری از طریق آزمون تی به وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد و معنی‌دار بودن اختلاف بیان ژن مورد نظر در سویه‌های موتان و سویه کنترل (تیپ وحشی) ارزیابی شد ($P < 0.05$). بعد از سنتز کتابخانه cDNA با کمک آغازگرهای تصادفی از های RNA خالص برای اطمینان از سنتز cDNA ژن‌های *gapA* و *ompF*، واکنش PCR برای هر یک از نمونه‌های cDNA با آغازگرهای اختصاصی ژن *gapA* و *ompF* انجام شد. شکل ۱ نتیجه ژل الکتروفورز یکی از نمونه‌ها برای ژن‌های *ompF* و *gapA* را نشان می‌دهد. با انجام واکنش PCR در زمان واقعی، منحنی تکثیر نمونه‌ها و چرخه آستانه (Ct) برای هریک از نمونه‌ها توسط نرم‌افزار دستگاه تعیین شد (شکل ۲). منحنی ذوب این دو ژن تنها یک قله را نشان داد که تکثیراختصاصی ژن‌های مورد نظر و عدم آزادگی به DNA ژنومی در واکنش می‌باشد. نقطه ذوب (E) بازدهی PCR در زمان واقعی و Ct نقطه تماس منحنی تکثیر با خط آستانه است و در واقع سیکلی است که در آن میزان

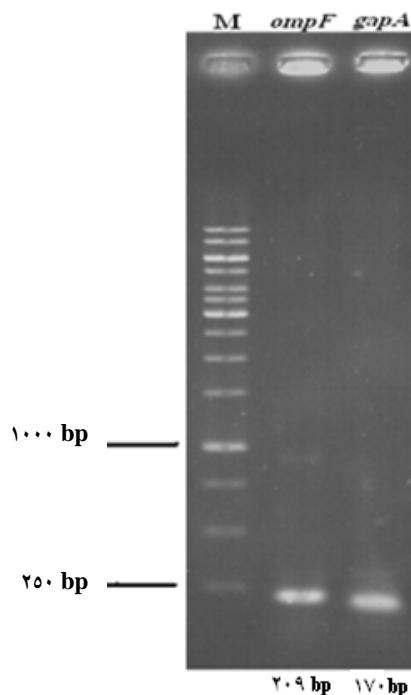
برای سنتز cDNA از کیت فرمتاز Reverse Transcriptase استفاده شد و تمام مراحل کار طبق دستورالعمل cDNA برای سنتز RNA استفاده شد. در این تحقیق همه واکنش‌های PCR در زمان واقعی مطابق با دستورالعمل کیت تاکارا انجام شد. توالی آغازگرهای استفاده شده در جدول ۲ ارایه شده و واکنش‌های حرارتی قبله توصیف شده است (Viveiros et al. 2007).

داده‌های حاصل به روش سنجش بیان نسبی ارزیابی شدند (Pfaffl et al. 2002). همچنین برای هر موتان دو نمونه جهت واکنش PCR تهیه شد (دو تکرار). برای این منظور همه داده‌ها با ژن *gapA* ضروری به عنوان کنترل داخلی نرمال شدند. بیان کمی نسبی از نسبت زیر بدست می‌آید:

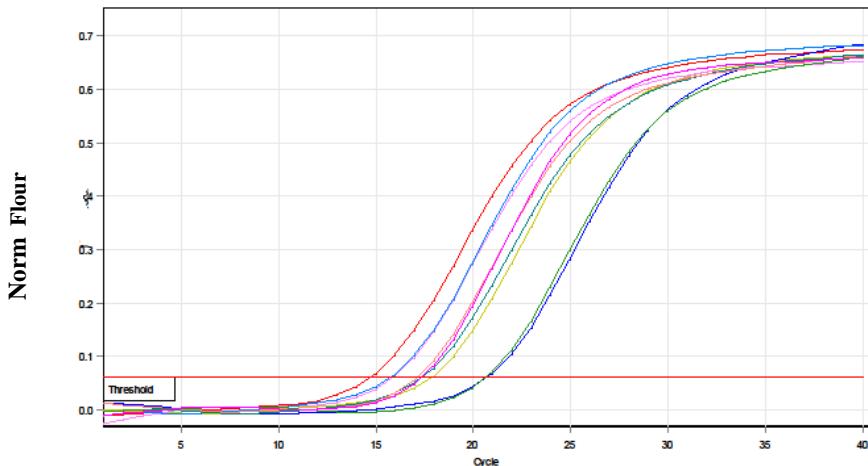
$$\text{نسبت} = (\text{E}_{\text{ompF}})^{\Delta \text{Ct}} / (\text{E}_{\text{gapA}})^{\Delta \text{Ct}}$$

موتان Ct - سویه تیپ وحشی

(E) بازدهی PCR در زمان واقعی و Ct نقطه تماس منحنی تکثیر با خط آستانه است و در واقع سیکلی است که در آن میزان



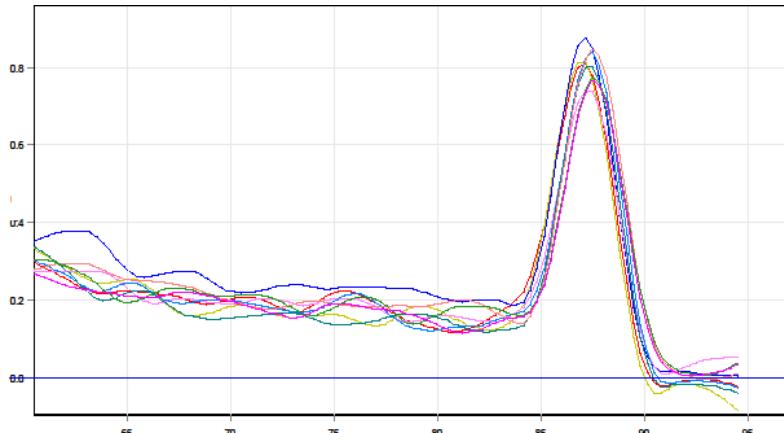
شکل ۱- ژل الکتروفورز محصول PCR. چاهک اول از چپ مربوط به نشانگر DNA و دو چاهک بعدی به ترتیب مربوط به ژن *ompF* و *gapA* می‌باشد. اندازه هر محصول زیر نویس شده است.



شکل ۲- منحنی تکثیر ژن *ompF* در سویه کنترل و موتان‌ها. منحنی آبی کمرنگ مربوط به سویه تیپ وحشی و مابقی مربوط به موتان‌ها است.

نشان‌دهنده این باشد که مقاومت سطح پایین و متوسط این موتان‌ها به سپروفلوکساسین و تتراسیکلین باعث کاهش بیان ژن *ompF* نشده است. یافته‌های این تحقیق مشابه تحقیق قبلی در این زمینه است (Vinson et al. 2010). البته ممکن است با بررسی سویه‌هایی با مقاومت بیشتر برای سپروفلوکساسین و تتراسیکلین، اختلاف معنی‌داری در بیان *ompF* در سویه‌های موتان نسبت

شب منحنی استاندارد برای ژن *ompF* و *gapA* به ترتیب برابر با ۳/۵۲۲ و ۳/۱- بود که در محدوده متداول برای بررسی بیان می‌باشد. بنابراین از Ct های بدست آمده جهت محاسبه بیان استفاده شد. بیان نسبی *ompF* در موتان‌ها و نمونه کنترل با روش Pfaffl (2002) محاسبه شد (جدول ۳). مقایسه نتایج بیان ژن *ompF* در هر یک از نمونه‌های موتان نسبت به سویه تیپ وحشی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$). این مسئله می‌تواند

شکل ۳- منحنی ذوب ژن *ompF* در سویه کنترل و موتان‌ها

منابع

- Alekshun MN, Levy SB (1997) Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 2067-2075.
- Barnard FM, Maxwell A (2001) Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser⁸³ and Asp⁸⁷. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45: 1994-2000.
- Cohen SP, Hachler H, Levy SB (1993) Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance mar-locus in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 175: 1484-1492.
- Forst S, Delihas N (2001) MicF: An antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *Journal of Molecular Biology* 313: 1-12.
- George AM, Levy SB (1983) Amplifiable resistance to tetracycline, chloramphenicol and other antibiotics in *Escherichia coli*: involvement of a non-plasmid determined efflux of tetracycline. *Journal of Bacteriology* 155: 531-540.
- Karczmarczyk M, Martins M, Quinn T, Leonard N, Fanning S (2011) Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 7113-7120.
- Kishii R, Takei M (2009) Relationship between the expression of OmpF and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Infection Chemotherapy* 15: 361-366.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST ©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: 1-10.

جدول ۳- بیان نسبی ژن *ompF*

سویه/ موتان/ کلون	بیان نسبی ژن <i>ompF</i>
MG1655	۱±۰
W25*	۰/۸ ± ۰/۰۱
W26	۰/۸۵ ± ۰/۰۱۲
W49	۰/۷۵۶ ± ۰/۰۲
RE6	۰/۷ ± ۰/۰۱۵
RE16	۰/۷۵ ± ۰/۰۱

به تیپ وحشی یافت شود. به طوری که در یک تحقیق مشابه از ۱۲ سویه مقاوم به سیپروفلوکساسین که مقاومت آنها بین ۴ µg/ml تا بیش از ۳۲µg/ml بود، ۱۱ سویه کاهش تولید OmpF را نشان دادند (Karczmarczyk et al. 2011).

در نتیجه پیدایش فنوتیپ مقاومت چندگانه می‌تواند در ارتباط با کاهش بیان mRNA ژن *ompF* در موتان‌های با مقاومت بالا به فلوروکینولون‌ها باشد. ولی مقاومت سطح پایین و متوسط به آنها منجر به کاهش بیان mRNA ژن *ompF* نمی‌شود.

سپاسگزاری

به این ترتیب کمال تشكر و سپاسگزاری را از دانشگاه شهرکرد و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه شهرکرد جهت حمایت مالی این تحقیق داریم.

Pourahmad Jaktaji R, Mohiti E (2010) Study of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 9: 43-45.

Pourahmad Jaktaji R, Ebadi R, Karimi M (2012) Study of organic solvent tolerance and increased antibiotic resistance properties in *E. coli* *gyrA* mutants. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 11:595-600.

Pourahmad Jaktaji R, Ebadi R (2013) Generation of clones with higher resistance to tetracycline and chloramphenicol from ciprofluoxacin resistant *Escherichia coli* mutants. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 4: 3063-3067.

Ruiz J (2003) Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA

gyrase protection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 51: 1109-1117.

Seone AS, Levy SB (1995) Characterization of *marR*, the repressor of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 177: 3414-3417.

Vinson HM, Gautam A, Olet S, Gibbs PS, Barigye R (2010) Molecular analysis of porin gene transcription in heterogenotypic multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from scouring calves. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 65: 1926-1935.

Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, Couto I, Davin-Regli A, Martins M, Pages JM, Amaral L (2007) Antibiotic Stress, Genetic Response and Altered Permeability of *E. coli*. PLoS ONE 2: e365.