

## بررسی نقش ژن orfD سویه *Pseudomonas aeruginosa* H103 در جذب گلوکز

دکتر نیما حسینی جزینی<sup>۱\*</sup>، دکتر احیاء عبدی عالی<sup>۲</sup> و دکتر الیزابت ورویک<sup>۳</sup>

### خلاصه

**مقدمه:** سودوموناس آئروجینوزا باکتری گرم منفی میله‌ای شکل از گروه باکتری‌های غیر تخمیر کننده گلوکز است که بخشی از فلور طبیعی نواحی مختلف بدن را در افراد سالم تشکیل می‌دهد. این باکتری در مایعات و سطوح مختلف بیمارستانی تا مدت‌های طولانی زنده می‌ماند. سودوموناس آئروجینوزا دارای دو سیستم متفاوت برای جذب گلوکز است که اولی یک مسیر اکسیداتیو با کارایی کم و دومی یک مسیر فسفریلاتیو با کارایی بالا می‌باشد. ژن‌های orfD و orfB,orfC حدوداً دو میلیون جفت باز با ژن‌های مربوط به سیستم جذبی با کارایی بالا فاصله دارند. عملکرد دقیق این ژن‌ها در سودوموناس آئروجینوزا به خوبی شناخته نشده است ولی احتمال دارد در تنظیم جذب گلوکز به داخل سلول نقش داشته باشند. در پژوهش حاضر نقش ناحیه ژنی orfD در سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا بر روی سرعت جذب گلوکز مورد بررسی قرار گرفت.

**روش:** به این منظور ناحیه ژنی orfD در پلاسمید pUCP20 کلون شد و به سویه جهش یافته سودوموناس آئروجینوزا (WMA200) که دارای یک جهش حذفی بر روی کروموزوم در ناحیه سه قالب بازخواندنی orfB,orfC و orfD بود، انتقال داده شد سپس سرعت جذب گلوکز توسط سویه (WMA200)، سویه وحشی H103 و سویه نوترکیب حاوی ژن orfD (WMA200/pUCP20/orfD) با استفاده از گلوکز نشاندار تعیین شده و مورد مقایسه قرار گرفت.

**یافته‌ها:** با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش اندازه‌گیری سرعت جذب گلوکز توسط سه سویه فوق‌الذکر، مشاهده شد که سرعت جذب گلوکز توسط سویه کلون شده با ژن orfD در مقایسه با سویه وحشی کمتر و در مقایسه با سویه جهش یافته فاقد این ژن بیشتر است.

**نتیجه‌گیری:** بنابر این می‌توان نتیجه گرفت که ژن orfD در افزایش جذب گلوکز به داخل سلول نقش دارد. به هر حال مکانیسم عملکرد این ژن هنوز ناشناخته است و مطالعات بیشتر جهت تعیین مکانیسم تأثیر ژن orfD در افزایش جذب گلوکز در سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا ضروری است.

**واژه‌های کلیدی:** سودوموناس آئروجینوزا، جذب گلوکز، orfD، orfC، orfB

۱- استادیار گروه میکروب شناسی، ایمنی شناسی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ارومیه ۲- استادیار میکروب شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه الزهراء ۳- دانشیار میکروب شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه مانیتوبا، کانادا

\* نویسنده مسؤؤل: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه • آدرس پست الکترونیک: [n.jazani@umsu.ac.ir](mailto:n.jazani@umsu.ac.ir)

دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۴/۷ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۷/۱۷ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۸/۱۷

## مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا باکتری گرم منفی میله‌ای شکل از گروه باکتری‌های غیر تخمیرکننده گلوکز است که بخشی از فلور طبیعی را در افراد سالم در نواحی مختلف بدن از جمله زیر بغل، دستگاه تنفسی و حلق تشکیل می‌دهد. این باکتری می‌تواند در مایعات و سطوح مختلف به خصوص سطوح مرطوب حمام و دستشویی، تجهیزات تنفسی، مایعات دیالیز و... تا مدت‌های طولانی زنده بماند (۴).

باکتری مزبور یک باکتری بیماری‌زای فرصت طلب است که به ویژه عامل عفونت‌های کشنده در افراد مبتلا به ضعف ایمنی از جمله بیماران مبتلا به ایدز، مبتلایان به نقص ژنتیکی سیستمیک فیبروزیس، بیماران مبتلا به سرطان، بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه و بیماران دچار سوختگی به شمار می‌آید (۸،۲۳). این باکتری به علت مقاومت ذاتی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج در بیمارستان‌ها، عامل مهم عفونت‌های بیمارستانی از جمله پنومونی، عفونت‌های بعد از اعمال جراحی، عفونت‌های ادراری و گندخون می‌باشد و یکی از مشکلات مهم کنترل عفونت در بیمارستان‌ها است. سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا هم‌چنین نسبت به سایر عوامل ضدباکتریایی غیر آنتی‌بیوتیکی نیز مقاومت بالایی نشان می‌دهند (۴،۷،۹،۱۰،۱۲،۱۳،۱۸،۱۹). یکی از عوامل مهم دخیل در مقاومت بالای این میکروارگانیسم نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها نفوذناپذیری غشاء خارجی باکتری وابسته به عملکرد پورین‌ها می‌باشد بطوری که نفوذپذیری غشاء خارجی سودوموناس آئروجینوزا در مقایسه با اشرشیاکلی ۱۰ تا ۱۰۰ برابر کمتر است. پورین‌های مستقر در غشاء خارجی سودوموناس آئروجینوزا نیز در بیماری‌زایی باکتری نقش مهمی به عهده دارند. همچنین این پورین‌ها در انتقال مواد غذایی مختلف از جمله کربوهیدرات‌های مختلف به داخل سلول باکتری نقش دارند (۱۱،۲۸). شناسایی ژن‌های کدکننده و مطالعه عملکرد پورین‌ها و نیز شناسایی ژن‌های دخیل در تنظیم عملکرد ژن‌های کدکننده پورین‌ها می‌تواند در درک بهتر پاتوژنز این باکتری کمک کننده باشد.

سودوموناس آئروجینوزا دارای دو سیستم متفاوت برای جذب گلوکز است که اولی یک مسیر اکسداثیو با کارایی کم و دومی یک مسیر فسفریلاتیو با کارایی بالاست. سیستم دوم متشکل از یک پورین اختصاصی برای سوسترها تحت عنوان پورین OprB، یک پروتئین متصل شونده به گلوکز مستقر در

فضای پری پلاسمی تحت عنوان (GBP)، ATP آز مستقر در غشاء سیتوپلاسمی، GltK و یک تنظیم‌کننده دو قسمتی می‌باشد (۶،۱۶،۲۴،۲۷).

ژن‌های orfBCD (Open reading frame BCD) یک خوشه ژنی با طول تقریبی ۴/۹ کیلو جفت بازی است که حاوی چند قالب باز خواندنی می‌باشند که حدوداً دو میلیون جفت باز با ژن‌های مربوط به سیستم جذبی با کارایی بالا فاصله دارند و احتمالاً چند پروتئین کد می‌کنند که در تنظیم انتقال گلوکز به داخل سلول نقش دارند (۱،۱۴). آنالیز ژنومی سودوموناس آئروجینوزا نشان داده است که orfD از لحاظ ساختار ژنومی دارای ۹۵٪ شباهت با اسپرمیدین سنتتاز اشرشیاکلی است. این آنزیم در اشرشیاکلی پلی آمین پوترسین را به اسپرمیدین تبدیل می‌کند (۱۴،۲۰). به هر حال وظیفه ناحیه ژنی orfD در سودوموناس آئروجینوزا ناشناخته باقی مانده است ولی احتمال دارد در گلیکوزیلاسیون پروتئین‌های تاژک در سودوموناس آئروجینوزا نیز نقشی به عهده داشته باشد (۳).

با توجه به اهمیت پورین‌ها و پروتئین‌های وابسته به آنها در انتقال آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل سلول و نیز نقشی که سیستم‌های ناقل قندها مانند oprB و سایر سیستم‌های وابسته به آن مانند orfBCD در انتقال قندها به داخل سلول و در نتیجه بیوسنتز آلزینات که یکی از مهم‌ترین شاخص‌های ویروالانس در سودوموناس آئروجینوزاست، دارند، در پژوهش حاضر سعی در مطالعه نقش ناحیه ژنی orfD بر روی سرعت انتقال گلوکز به داخل سلول شد.

## روش بررسی

پلاسمید pUCp20 به عنوان وکتور برای کلنیزاسیون ژن orfD مورد استفاده قرار گرفت. استقرار ژن orfD در پلاسمید فوق‌الذکر با موفقیت انجام گرفت. سپس پلاسمید نوترکیب pUCp20/orfD به سویه جهش یافته سودوموناس آئروجینوزا WMA200 که دارای یک جهش حذفی در ناحیه مربوط به سه ژن فوق‌الذکر بود و نیز به یک سویه اشرشیاکلی تحت عنوان *E. coli* NM522 انتقال داده شد و توانایی هر دو سویه نوترکیب در جذب گلوکز اندازه‌گیری شده و با سویه وحشی سودوموناس آئروجینوزا تحت عنوان *P. aeruginosa* H103 که حاوی ژن‌های orfB، orfC، orfD می‌باشد و نیز سویه جهش یافته WMA200 که فاقد این سه ژن می‌باشد مورد مقایسه قرار گرفت.

سویه‌های باکتریایی:

در این مطالعه سویه‌های متعدد اشرشیاکلی و سودوموناس آئروجینوزا که قبلاً تهیه شده بود مورد استفاده قرار گرفت. خصوصیات هر یک از سویه‌ها در جدول ۱ ذکر شده است (۱، ۲، ۲۵).

قطعه ژنی *orfCD* به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت. مناسب‌ترین دمای ذوب و زمان طویل شدن در حین کار به طور تجربی تعیین شد. دمای ذوب (melting temperature) ۵۴ درجه سانتی‌گراد و زمان طویل شدن (Extension time) در هنگام کار با پرایمرها ۲/۵ دقیقه بود.

جدول ۱: نام و خصوصیات کلیه سویه‌های باکتری مورد استفاده

سویه باکتریایی	خصوصیات سویه
<i>E. coli</i> NM522	سویه زمینه مناسب برای دریافت و کتور (فاقد پلاسمید)
<i>E. coli</i> /pUCP20	سویه زمینه حاوی و کتور pUCP20
<i>E. coli</i> /pUCP20/orfD	سویه زمینه کلون شده با و کتور حاوی <i>orfD</i>
<i>P. aeruginosa</i> H103	سویه وحشی سودوموناس آئروجینوزا دارای ژن‌های <i>orfBCD</i>
<i>P. aeruginosa</i> WMA200	سویه جهش یافته سودوموناس آئروجینوزا (فاقد ژن‌های <i>orfBCD</i> )
<i>P. aeruginosa</i> WMA200/pUCP20	سویه جهش یافته سودوموناس آئروجینوزا حاوی و کتور pUCP20 (فاقد ژن‌های <i>orfBCD</i> )
<i>P. aeruginosa</i> WMA200/pUCP20/orfD	سویه جهش یافته سودوموناس آئروجینوزا کلون شده با و کتور حاوی <i>orfD</i>

جدول ۲: توالی پرایمرهای طراحی شده به منظور تکثیر ژن *orfD*

نام پرایمر	توالی پرایمر
D1	5' TGGTGGAAATTCGCGCCATT3'
D2	5' GAGGCAGGATCCTACTAGG3'

توالی‌های نمایش داده شده مکمل دو انتهای ژن ذکر شده‌اند.

الکتروفورز قطعات تکثیر شده بر روی ژل آگارز و استخراج قطعات:

۵ میکرولیتر از نمونه حاصل از روش PCR همراه با ۴ میکرولیتر بافر نمونه بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ لود شد و در کنار ۴ میکرولیتر از مارکر مربوط به وزن ملکولی به مدت حدوداً یک ساعت با ولتاژ ۸۰-۷۰ الکتروفورز شد (۲۱). باند مربوط به *orfD* بر روی ژل شناسایی شد و با استفاده از کیت مخصوص با روش اولتراکلین طبق دستورالعمل سازنده از ژل استخراج شد و تا زمان استفاده برای لیگاسیون در منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Bio/CAN.Scientific).

برش پلاسمید pUCP20 با آنزیم‌های محدودالتر:

پلاسمید pUCP20 با روش لیز قلیایی استخراج شد و با استفاده از آنزیم‌های محدودالتر BamH1 و HindIII برش داده شد. نمونه حاصل بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ لود و الکتروفورز شد و سپس با روش اولتراکلین از ژل استخراج شد و تا زمان استفاده برای لیگاسیون در منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۱، ۲۲).

لیگاسیون پلاسمید pUCP20 با قطعه ژنی *orfD*:

لیگاسیون با استفاده از نسبت‌های متفاوتی از قطعه ژنی / و کتور انجام شد (۳/۱۲ و ۴/۱۱ و ۵/۱۰ و ۶/۹). حجم کلی مخلوط حاصل همواره ۱۵ میکرولیتر بود که به آن ۴ میکرولیتر بافر لیگاسیون و یک میکرولیتر لیگاز اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت یک شب در ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پلاسمید نو ترکیب حاصل تا زمان استفاده برای ترانسفورماسیون در سلول‌های *E. coli* MN522 و *P. aeruginosa* WMA200 در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

جداسازی *orfCD* از پلاسمید pBL100:

قطعه *orfCD* قبلاً در سویه وحشی سودوموناس آئروجینوزا شناسایی شده و از محل مناسب برش داده شده بود و در پلاسمید pBL100 کلون شده بود (۱، ۲). *orfCD* قطعه‌ای به طول حدوداً دو کیلو باز است که بر روی این پلاسمید قرار دارد. پلاسمید مورد نظر با روش لیز قلیایی (Plasmid miniprep-alkaline lysis) استخراج شد (۲۲) و با آنزیم‌های BamH1 و HindIII برش داده شد و قطعه *orfCD* از پلاسمید جداسازی شد.

تکثیر قطعه ژنی *orfD* و *orfC* با روش PCR:

پرایمرهای مناسب به منظور تکثیر جداگانه قطعه ژنی *orfD* با روش PCR طراحی شد. پرایمرهای فوق‌الذکر بر اساس ابتدا و انتهای قطعات ژنی *orfD* (۱، ۲۰) طراحی شده و به صورت D1- (D2) نام‌گذاری شدند (Invitrogen/Canada). توالی پرایمرهای فوق‌الذکر در جدول ۲ ذکر شده است. بنابر این در روش PCR

کشت داده شده بودند در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب سلولی حاصل ۲ مرتبه با ۱۰ سی سی محیط BM2 فاقد کربوهیدرات شستشو داده شد و مجدداً در همین محیط سوسپانسه شد و کدورت آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر در ۰/۲ تنظیم شد. سوسپانسیون‌های سلولی به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از آن آزمایش مربوط به تعیین میزان جذب گلوکز آغاز شد. مقدار مشخص (۲/۹mCi/mmol) از گلوکز نشان‌دار به سلول‌های باکتریایی اضافه شد و در زمان‌های صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ ثانیه ۲ دقیقه بعد از افزودن قند از محیط نمونه برداری شد. ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه با استفاده از یک صافی ۰/۴۵ میکرون صاف شد. با استفاده از ۵ سی سی محیط BM2 فاقد کربوهیدرات صافی‌ها به حد کافی شستشو داده شدند. فیلترها به ظروف شیشه‌ای در پیچ‌دار مخصوص منتقل شده و به هر یک از ظروف ۱۰ سی سی مایع سنتیلاسیون اضافه شد و با استفاده از دستگاه بتا کانتور مقدار ماده رادیواکتیو در هر نمونه مشخص شد (۱،۲۶).

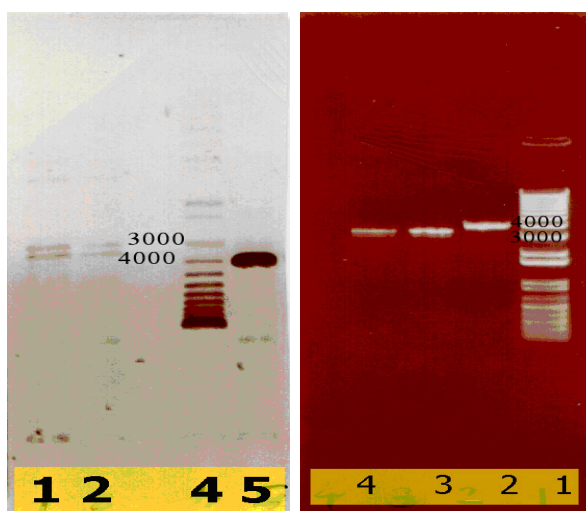
تعیین توالی آمینواسیدی و SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis)

نمونه‌های پروتئین با روش لیز کامل سلولی سوبه‌های باکتریایی مورد نظر تهیه شد و غلظت پروتئین در نمونه‌ها با اندازه‌گیری جذب نمونه در طول موج ۲۸۰ نانومتر محاسبه شد. این نمونه‌ها در بافر حاوی ۰/۴٪ (حجم/وزن)، Tris-HCl ۱۲ میلی‌مولار، گلیسرول ۲٪ (حجم/وزن) و ۱٪ بتامرکاپتواتانل حل شد و سپس نمونه‌ها قبل از لود شدن به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شدند. الکتروفورز نمونه‌های پروتئین در حضور مارکر وزن ملکولی بر روی رانینگ ژل ۱۲٪ (حجم/وزن) پلی‌اکریل‌امیدی و ژل جداکننده ۵٪ (حجم/وزن) پلی‌اکریل‌امیدی در ولتاژ ۲۰۰-۱۰۰ انجام شد. ژل یک شب در رنگ کوماسی بلو حاوی ۰/۴W/V، کوماسی برلیان بلو R-250، ایزوپروپانل (حجم/حجم ۳۰٪) و اسیداستیک (حجم/حجم ۱۰٪) قرار گرفت و به مدت ۱۲-۸ ساعت در محلول حاوی ۲۰٪ متانل و ۷/۵٪ اسیداستیک رنگ‌بری شد (۱۵). جهت بررسی ساختار پروتئین کد شده توسط ناحیه ژنی orfD تعیین توالی آمینواسیدی انجام شد. باندهای پروتئینی موجود در روی ژل پلی‌اکریل‌امیدی با روش وسترن‌بلات بر روی یک غشاء پلی‌وینیلیدن دی‌فلوراید (PVDF) [Polyvinylidene difluoride (PVDF)] و Immobilon-P membrane منتقل شد و سپس غشاء PVDF به مدت ۲-۳ ثانیه در متانل خیس خورد و سپس به مدت ۵ دقیقه در

ترانسفورماسیون *E. coli* MN522 با پلاسمید pUCP20/orfD: برای ترانسفورماسیون، سلول‌های صلاحیت‌دار (Competent cell) *E. coli* MN522 و *P. aeruginosa* WMA200 با افزودن ۲۵ سی سی محلول ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید منیزیم سرد به رسوب سلولی حاصل از کشت باکتری‌ها در محیط مایع وانکوباسیون آن در یخ به مدت کافی، سانتریفوژ نمونه و دو بار تکرار روش به دست آمد. نهایتاً سلول‌های صلاحیت‌دار به دست آمده در ۵ سی سی محلول ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید منیزیم حاوی گلیسرول در حجم‌های ۲۰۰ میکرولیتری تقسیم شده و در فریزر منهای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ۵ میکرولیتر از مخلوط حاوی پلاسمید نوترکیب در ۲۵ میکرولیتر از بافر مناسب به ۲۰۰ میکرولیتر از سلول‌های صلاحیت‌دار اضافه شد و نمونه به مدت ۱ ساعت در یخ انکوبه شد و سپس ۳ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و مجدداً به مدت ۵ دقیقه در یخ انکوبه شد. ۰/۵ سی سی برات (LB (Luria Bertani Broth) به نمونه اضافه شد و نمونه به مدت ۲/۵-۱ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس روی محیط کشت مناسب کشت داده شد. سلول‌های ترانس فورم شده بر روی محیط حاوی IPTG، X-Gal و آمپی‌سیلین جداسازی شده و کلنی‌های سفیدرنگی که در روی این محیط کشت رشد نمودند به عنوان کلنی‌های نوترکیب در نظر گرفته شدند (۲۱،۲۲). پلاسمیدهای موجود در سوبه‌های نوترکیب با روش لیز قلیایی مجدداً جداسازی شده و قطعه orfD با آنزیم‌های محدودالثری که قبلاً استفاده شده بود مجدداً برش داده شد و با روش PCR تکثیر شد. نمونه حاصل مجدداً در حضور مارکر وزن ملکولی بر روی ژل آگارز الکتروفورز شده و قطعه ژنی مورد نظر با روش اولتراکلین از ژل استخراج شد و در مرکز مربوطه تعیین توالی شده و به عنوان قطعه orfD مورد تأیید قرار گرفت. سوبه‌های *E. coli* MN522/pUCP20/orfD و *P. aeruginosa* WMA200/pUCP20/orfD برای اندازه‌گیری میزان جذب گلوکز در مقایسه با سوبه‌های وحشی و سوبه جهش یافته فاقد orfD مورد استفاده قرار گرفتند. هم‌چنین کلیه سوبه‌های جهش یافته، سوبه‌های وحشی، سوبه‌های نوترکیب حاوی پلاسمید pUCP20 و سوبه‌های حاوی پلاسمید pUCP20/orfD لیز شده و از لحاظ کل محتوای پروتئینی خود مورد بررسی قرار گرفتند (۱،۲،۳،۴،۲۰،۲۱،۲۲،۲۵).

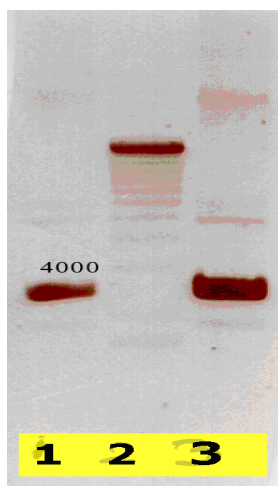
اندازه‌گیری سرعت جذب گلوکز:

۵۰ میلی‌لیتر از کشت مایع سوبه‌های تحت آزمایش که یک شب در محیط کشت BM2 حاوی ۲۰ میلی‌مول گلوکز



الف ب

**شکل ۱:** الف: باندهای مربوط به پلاسمید *pBL100* پس از استخراج پلاسمید با روش لیز قلیایی. نمونه در چاهک‌های ۳ و ۴ لود شده است، در چاهک ۱ مارکر وزن ملکولی لود شده است (۱۰۰-۲۰۰-۳۰۰-۴۰۰-۵۰۰-۶۵۰-۸۰۰-۹۰۰-۱۰۰۰-۱۱۰۰۰-۱۲۰۰۰). ب: باندهای مربوط به هضم دوگانه پلاسمید *pBL100* با آنزیم‌های *BamHI* و *HindIII* نمونه در چاهک‌های ۱ و ۲ لود شده است. در چاهک ۴ مارکر وزن ملکولی لود شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در اثر هضم دوگانه این پلاسمید ۲ باندهای روی ژل آگارز به دست آمده است که احتمالاً قطعه سنگین‌تر ( $330 \text{ Kbp}$ ) مربوط به *orfCD* می‌باشد.



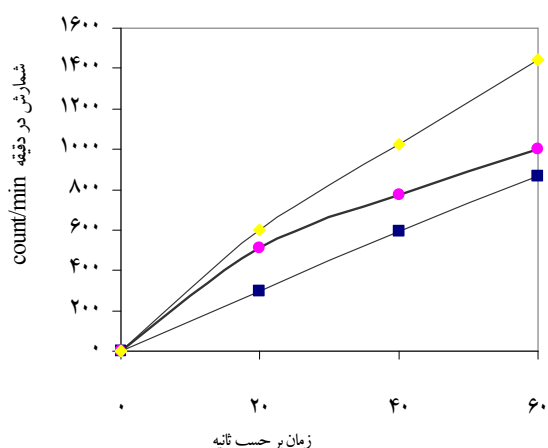
**شکل ۲:** باندهای مربوط به پلاسمید *pUCP20* پس از استخراج پلاسمید با روش لیز قلیایی. نمونه در چاهک‌های ۱ و ۳ لود شده است، در ردیف ۲ مارکر وزن ملکولی لود شده است.

پتری دیش حاوی بافر (Cyclohexylamino-1-propanesulfonic acid, CAPS) 10% V/V methanol با ۱۰ میلی‌مولار با  $\text{pH}=11$  قرار گرفت. الکتروبلاتینگ به مدت ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ (۳۰۰ میلی‌آمپر) در دمای اتاق در سل ترانس بلات و در بافر CAPS انجام شد. غشاء حاصل به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر آبکشی شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در رنگ پانسو-S (Ponceau-S) (حاوی حجم/وزن ۰/۲٪ پانسو-S در ۱۰۰ سی‌سی حجم/وزن تری کلرواستیک اسید) قرار گرفت، سپس در آب مقطر آبکشی شد و دو مرتبه هر بار به مدت ۳-۵ دقیقه با رنگ‌بر (اسیداستیک حجم/حجم ۵٪) شسته شد و مجدداً دو مرتبه هر بار به مدت ۲-۱ دقیقه با آب مقطر شسته شد و به مدت یک شب بین دو لایه از کاغذهای صافی واتمن قرار گرفت تا خشک شود (۱،۲). سپس باندهای پروتئینی از غشاء خشک شده بریده شد و جهت تعیین توالی پروتئین به دانشگاه ویکتوریا، کانادا (UVic-GenomeBC Proteomics Centre) ارسال شد و در این مرکز توالی پپتید حاصل از بیان ژن با روش mass spectrometry تعیین شد.

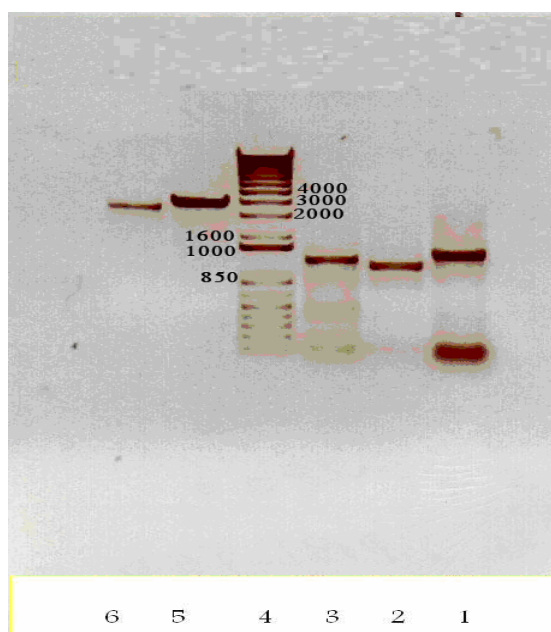
## نتایج

شکل ۱ و ۲ به ترتیب نتایج مربوط به استخراج پلاسمید *pBL100* و *pUCP20* را با روش لیز قلیایی نشان می‌دهد. شکل ۳ نتایج مربوط به هضم دوگانه (Double digestion) پلاسمید *pUCP20* با آنزیم‌های محدودالتر *BamHI* و *HindIII* را نشان می‌دهد. شکل ۳ باندهای حاصل از قطعات ژنی *orfC* و *orfD* را پس از تکثیر با روش PCR نشان می‌دهد. نتایج مربوط به اولتراکلین پلاسمید *pUCP20* و قطعه *orfCD* در شکل ۴ نشان داده شده است.

نتایج مربوط به مقایسه میزان جذب گلوکز دارای کربن نشان‌دار توسط سویه H103 سودوموناس آئروجینوزا، سویه جهش یافته WMA200 سودوموناس آئروجینوزا و سویه نوترکیب WMA200/*orfD* در شکل ۵ نشان داده شده است، همچنان که در شکل مشاهده می‌شود جذب گلوکز حاوی کربن ۱۴ در سویه جهش یافته WMA200 فاقد قطعات ژنی *orfD*، *orfC*، *orfB* در مقایسه با سویه وحشی H103 سودوموناس آئروجینوزا که این ژن‌ها را داراست کمتر است، در صورتی که سرعت جذب گلوکز توسط سویه موتان کامل شده توسط قطعه ژنی *orfD* در مقایسه با سویه WMA200 بیشتر ولی از سویه وحشی H103 کمتر است (شکل ۵).



**شکل ۵:** جذب گلوکز توسط سودوموناس آئروجینوزای H103 (شکل لوزی)، سویه جهش یافته WMA200 (شکل مربع)، و سویه موتان WMA200/pUCP20/orfD حاوی قطعه ژنی orfD (شکل دایره).



**شکل ۳:** هضم دوگانه پلاسمید pUCP20 (چاهک ۵) با آنزیم‌های محدودالتر BamHI و HindIII مارکر وزن ملکولی در چاهک ۴ لود شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود در اثر هضم دوگانه پلاسمید pUCP20 با آنزیم‌های فوق‌الذکر تنها یک باند به دست آمده است. در چاهک ۲ و ۳ به ترتیب محصول تکثیر قطعات ژنی orfC و orfD پس از تکثیر با روش PCR و در چاهک شماره ۶ قطعه orfCD پس از اولتراکلین لود شده است.

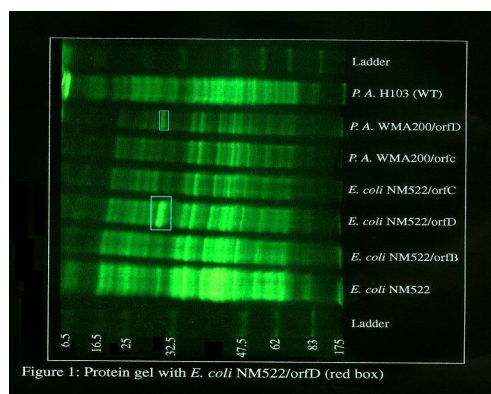
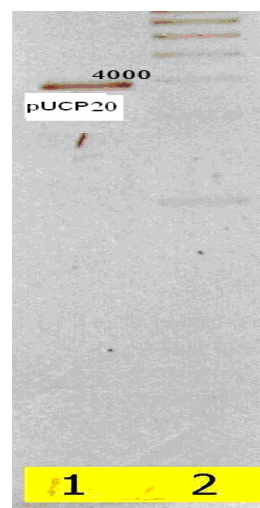


Figure 1: Protein gel with *E. coli* NMS22/orfD (red box)

**شکل ۶:** SDS-PAGE نمونه‌های پروتئینی حاصل از لیز کامل سلولی سویه‌های *P.aeruginosa* و *E.coli*/pUCP20/orfD در مقایسه با سایر گونه‌ها.

نتایج مربوط به بیان پروتئین کد شده توسط قطعه ژنی orfD کلون شده در اشرشیاکلی سویه NMS22 و سودوموناس آئروجینوزای سویه WMA200 در شکل ۶ نشان داده شده است. وزن ملکولی پروتئین حاصل از بیان قطعه ژنی orfD در سویه‌های نو ترکیب حدوداً ۳۲ کیلو دالتون است. نتایج مربوط به تعیین توالی اسیدهای آمینه در باند پروتئینی حاصل از بیان قطعه ژنی orfD در سویه‌های نو ترکیب از مرکز پروتئین دانشگاه ویکتوریا با توالی زیر گزارش شد:

Ser (Lys? Or Met)-Asp-Tyr- Gln- Glu- Thr- Leu- Tyr - Gln- Gly



**شکل ۴:** الف: باندهای حاصل پس از اولتراکلین باندهای مربوط به پلاسمید پس از استخراج با روش لیز قلیایی pUCP20 (چاهک شماره ۱)، مارکر (چاهک شماره ۲).

به طراحی واکنش‌های مناسب قابل استفاده در افراد در معرض خطر عفونت‌های ناشی از این باکتری دارند (۵).

یکی از پورین‌های مستقر در غشاء خارجی سودوموناس آئروجینوزا *oprB* است که ناقل گلوکز بوده و تمایل بالایی برای اتصال به گلوکز دارد. این پورین تنها در شرایطی که غلظت گلوکز در محیط کم باشد بیان می‌شود. هم‌چنین ثابت شده است که در بیماران مبتلا به عفونت‌های ناشی از سودوموناس این پروتئین در بدن بیان می‌شود، بنابراین احتمالاً این پروتئین و سایر سیستم‌های انتقالی وابسته به آن در پاتوژنز عفونت‌های سودوموناسی نقشی به عهده دارند (۱).

احتمالاً این پورین‌ها نقش مهمی در انتقال آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل سلول دارند، مثلاً ثابت شده است که مقاومت سودوموناس نسبت به ایمی‌پنم با کاهش بیان یک نوع پورین تحت عنوان پورین *oprD* همراه است. بنابراین کاهش نفوذپذیری غشاء به واسطه کاهش بیان پورین‌ها، امروزه به عنوان مهم‌ترین مکانیسم مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی و غیر بتالاکتامی در سودوموناس آئروجینوزا به شمار می‌آید (۱).

همچنین حضور سیستم‌های ناقل قندها مانند *oprB* و سایر سیستم‌های وابسته به آن مانند *orfBCD* و بیان آنها در بدن انسان در افزایش انتقال قندها به داخل سلول و در نتیجه بیوسنتز آلترینات که یک ترکیب آگزوپلی ساکاریدی بوده و یکی از مهم‌ترین فاکتورهای ویرولانسی این باکتری محسوب می‌شود، نقش مهمی به عهده دارند (۱).

بنابر این با توجه به نقش مهمی که این پورین‌ها در ایجاد مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر عوامل ضد میکروبی دارند و نیز کارایی آنها به عنوان واکنش در گروه‌های پرخطر می‌توان ادعا نمود که شناسایی ژن‌های کدکننده پورین‌ها و مطالعه عملکرد هر یک از آنها و نقشی که در انتقال مواد به داخل سلول باکتری دارند ممکن است به یافتن راه‌های بهتر در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری کمک کند.

قبلاً نشان داده شده است که سودوموناس آئروجینوزا دارای یک سیستم جذب با کارایی بالا برای جذب گلوکز است که متشکل از پروتئین‌های متعدد مستقر در غشاء خارجی، فضای پری‌پلاسمی و غشاء داخلی است. در این سیستم، گلوکز در حین فسفریلاسیون به داخل سلول منتقل می‌شود. جهت تولید و تنظیم پروتئین‌های دخیل در این سیستم ژن‌های متعدد فعالیت می‌کنند. یک خوشه ژنی *orfBCD* دو میلیون جفت بازی از این

همانطور که مشاهده می‌شود. نمونه‌های پروتئینی حاصل از سایر سویه‌ها به عنوان کنترل در چاهک‌های مختلف لود شده است. در چاهک اول مارکر وزن ملکولی (Bio-Rad) لود شده است. همانطور که مشاهده می‌شود قطعه ژنی *orfD* در هر دو سویه نام برده بیان شده است.

## بحث و نتیجه‌گیری

سودوموناس آئروجینوزا باکتری گرم منفی هوازی میله‌ای شکل، از گروه باکتری‌های غیر تخمیرکننده لاکتوز است. علی‌رغم فاکتورهای پاتوژنز متعدد موجود در این باکتری، سودوموناس آئروجینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب بوده و یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در افراد مبتلا به نوتروپنی، سوختگی و سیستمیک فیبروز محسوب می‌شود. یکی از مشکلات عمده در زمینه درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئروجینوزا در افراد مبتلا مقاومت چندگانه باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها است. ثابت شده است که نفوذپذیری غشاء خارجی سودوموناس آئروجینوزا در برابر برخی آنتی‌بیوتیک‌ها از قبیل آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی و نیز ترکیبات ساده‌تر در مقایسه با سایر باکتری‌های گرم منفی از جمله اشرشیاکلی بسیار کمتر است (۴،۷،۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۸،۱۹،۲۳،۲۸).

اغلب آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر در برابر باکتری‌های روده‌ای از طریق کانال‌های پورین انباشته از آب که در غشاء خارجی مستقر هستند از عرض غشاء خارجی عبور کرده و وارد سلول می‌شوند. این مسیرها کانال‌های کوچکی هستند که عبور ملکول‌های کوچک هیدروفیل را به طور غیر اختصاصی از عرض غشاء ممکن می‌کنند. بنابر این تصور می‌شود که نفوذپذیری کمتر غشاء خارجی سودوموناس آئروجینوزا در مقایسه با سایر باکتری‌های روده‌ای متأثر از خواص کانال‌های پورینی مستقر در غشاء خارجی است (۱۷). از طرفی ثابت شده است که پورین‌های مستقر در غشاء خارجی سودوموناس آئروجینوزا کانال‌های نسبتاً بزرگی را در مقایسه با سایر باکتری‌های گرم منفی در عرض غشاء خارجی ایجاد می‌کنند اما تعداد پورین‌های باز در این باکتری در مقایسه با اشرشیاکلی کمتر است (۲۸).

از طرف دیگر مقاومت بالای باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها درمان این عفونت‌ها را بسیار مشکل و حتی گاهی غیر ممکن نموده است، بنابر این بسیاری از محققین تمایل



توالی با توالی مورد انتظار حاصل از بیان قطعه orfD هم‌خوانی دارد (۱).

با توجه به نتایج به دست آمده آزمایش اندازه‌گیری سرعت جذب گلوکز توسط سه سویه سودوموناس آئروجینوزای WMA200/H103 و WMA200/Pucp20/orfD که در شکل ۵ نشان داده شده است، مشاهده می‌شود که سرعت جذب گلوکز توسط سویه کلون شده با ژن orfD در مقایسه با سویه وحشی کمتر و از سویه موتان فاقد این ژن بیشتر است. بنابر این می‌توان نتیجه گرفت که ژن orfD در افزایش جذب گلوکز به داخل سلول نقش دارد. مکانیسم افزایش جذب گلوکز به داخل سلول با واسطه عملکرد این ژن هنوز ناشناخته است و مطالعات بیشتر جهت تعیین مکانیسم تأثیر ژن orfD در افزایش جذب گلوکز در سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا ضروری است.

ناحیه فاصله دارد و به هر حال عملکرد این ناحیه ژنی در سودوموناس آئروجینوزا چندان مشخص نیست و احتمال دارد در تنظیم انتقال گلوکز به داخل سلول نقش داشته باشد (۱،۲،۳،۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵،۱۶،۱۷،۱۸،۱۹،۲۰،۲۱،۲۲،۲۳،۲۴،۲۵،۲۶).

به منظور بررسی نقش ناحیه ژنی orfD بر روی سرعت انتقال گلوکز به داخل سلول، این ژن در *E.coli* NM522 و سویه جهش یافته *P.aeruginosa* WMA200 کلون شد. نتایج مربوط به SDS-PAGE نمونه‌های حاصل از لیز کامل سلولی سویه‌ها نشان داد که قطعه ژنی orfD هم در سویه *E.coli* NM522 و هم در سویه *P.aeruginosa* WMA200 بیان شده است. وزن ملکولی پروتئین حاصل از بیان ژن حدوداً ۳۲ کیلودالتون بوده که با نتایج مطالعات قبلی درباره این پروتئین مطابقت دارد. هم‌چنین نتایج مربوط به تعیین توالی اسیدهای آمینه در باند پروتئینی حاصل از بیان قطعه ژنی orfD در سویه‌های نو ترکیب نشان داد که این

## Summary

### Role of orfD *Pseudomonas aeruginosa* H103 Gene in Glucose Uptake

Hosseini-Jazani N., PhD.<sup>1</sup>, Abdi-ali A., PhD.<sup>2</sup>, Worobec E., PhD.<sup>3</sup>

1. Assistant Professor of Microbiology, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences and Health Services, Urumieh, Iran. 2. Assistant Professor of Microbiology, School of Sciences, ALZAHRA University, Tehran, Iran. 3. Associate Professor of Microbiology, School of Sciences University of Manitoba, Winnipeg, Canada.

**Background:** *Pseudomonas aeruginosa* is a gram negative non facultative bacterium and one of the members of normal flora in different sites of body in healthy humans. This bacterium can resist in fluids and hospital environments for a long time. *Pseudomonas aeruginosa* has two systems for glucose uptake: a low affinity oxidative pathway and a high affinity phosphorylative pathway. The orfBCD genes are located over two million base pair upstream of the genes involved in the high affinity uptake system. Although the role of these genes are unknown by now, they may have a role in regulation of glucose uptake. In the present study, the role of orfD gene in glucose uptake in *P.aeruginosa* has been investigated.

**Method:** orfD fragment were cloned in pUCP20 as vector and the recombinant plasmid transferred into WMA200 strain of *P.aeruginosa*, a mutant strain of *P.aeruginosa* with a chromosomal deletion of orfBCD. So we compared the rate of glucose uptake by *P.aeruginosa* WMA200, *P.aeruginosa* WMA200/pUCP20/orfD and *P.aeruginosa* H103 as wild type strain of *P.aeruginosa* by using labeled glucose under conditions at low substrate concentration and low cell density.

**Results:** Carbohydrate uptake patterns differed considerably among three strains. The wild type is able to uptake glucose at a faster rate than the mutant; however, the mutant complemented with orfD shows an intermediate uptake comparing to the wild type and the mutant.

**Conclusion:** orfD gene has an important role in carbohydrate uptake in *P.aeruginosa* strains however further studies are required to determine the involved mechanism.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, Glucose uptake, OrfB, OrfC, OrfD

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2006; 13(4): 230-239



## References

1. Adewoye LO. Characterization of the glucose ABC transporter of *Pseudomonas aeruginosa*. Winnipeg (MB), Manitoba Univ, 1999.
2. Adewoye LO, Worobec EA. Identification and characterization of the *gltK* gene encoding a membrane-associated glucose transport protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 2000; 253(2): 323-30.
3. Arora SK, Wolfgang MC, Lory S, Rappaport R. Sequence Polymorphism in the glycosylation Island and flagellins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2004; 186(7): 2115-22.
4. Corana-Nakamura AL, Miranda-Novales MG, Leanos-Miranda B, Portillo-Gomez, L, Hernandez-Chavez A, Anthon-Rendon J, et al. Epidemiologic study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Arch Med Res* 2001; 32(3): 238-242.
5. Cripps AW, Peek K, Dunkley M, Vento K, Marjason JK, McIntyre ME, et al. Safety and immunogenicity of an oral inactivated whole-cell *Pseudomonas aeruginosa* vaccine administered to healthy human subjects *Infect Immun* 2006; 74(2): 968-74.
6. Cuskey SM, Wolff JA, Phibbs PV, Olsen JR. Cloning of genes specifying carbohydrate catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* 1985; 162(3): 865-71.
7. Doggett D: Microbiology of *Pseudomonas aeruginosa*. 1<sup>st</sup> ed., New York, Academic press, 1979; pp1-7.
8. Estahbanati HK, Kashani PP, Ghanaatpisheh F. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns* 2002; 28(4): 340-8.
9. Gilardt GL. *Pseudomonas* In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Truant JR, Hugh R and Gilardi GL(Editors). Manual of clinical microbiology. 4<sup>th</sup> ed., Washington D.C, Amer.Soci for Microbiol, 1985; pp350-72.
10. Govan JRW. *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*. In: Collee JG, Fugse AG, Masmion BP, Simmons A (Editors). Practical Medical Microbiology. 14<sup>th</sup> ed., London, Churchill Livingstone Edinburgh, 1990; pp413-22.
11. Hancock RE, Brinkman FS. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Ann Rev Microbiol* 2002; 56: 17-38.
12. Hugh R, Gilardi G. *Pseudomonas* In: Lennette EH, Spaulding EH, Tryant JP: Manual of clinical microbiology. 2<sup>nd</sup> ed., Washington D.C, Amer. Soci for Microbiol, 1974; pp250-69.
13. Lory S, Tai PC. Biochemical and genetic aspects of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Curr Top Microbiol Immunol* 1985; 118: 53-69.
14. Lu CD, Itoh Y, Nakada Y, Jiang Y. Functional Analysis and Regulation of the divergent *spuABCDEF**GH*-*spuI* Operons for Polyamine uptake and utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 2002; 184(14): 3765-73.
15. Lugtenberg B, Meijers J, Peters R, Van der Hoek P, Van Alphen L. Electrophoretic resolution of the major outer membrane protein of *Escherichia coli* K12 into four bands. *FEBS Lett* 1975; 58(1): 254-8.
16. Midgley M, Dawes EA. The regulation of transport of glucose and methyl  $\alpha$ -glucoside in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 1973; 132(2): 141-54.
17. Nikaido H, Nikaido K, Harayama S. Identification and Characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 1991; 260(2): 770-9.
18. Palleroni NJ. *Pseudomonas* In: Borriello S, Murray PR, Funke G(Editors). Topley and Wilson's Microbiology and microbial infections. 10<sup>th</sup> ed., New York, Oxford University press, 1998; pp1591-606.
19. Pruitt BA. Infections of burns and other wounds by *Pseudomonas aeruginosa*. In: Sabath L(Editor). *Pseudomonas aeruginosa*: the organism, diseases it causes, and their treatment. 1<sup>st</sup> ed., Bern, Hans Huber Publisher, 1980; pp55-70.
20. *Pseudomonas aeruginosa* Community Annotation Project: PseudoCAP. Available at: [www.cmdr.ubc.ca/bobh/PAAP.htm](http://www.cmdr.ubc.ca/bobh/PAAP.htm)
21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory press, 1989; pp719-22.
22. Sambrook J, Russell DW: Molecular cloning: A Laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed., New York, Cold Spring Harbor Laboratory press, 2001; pp1855-92.
23. Shahcheraghi F, Feizabadi MM, Yamin V, Abiri R, Abedian Z. Serovar determination, drug resistance patterns and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients at two hospitals of Tehran(Iran). *Burns* 2003; 29(6): 547-51.
24. Stinson MW, Cohen MA, Merrick JM. Purification

- and properties of the periplasmic glucose-binding protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1977; 131(2): 672-81.
25. West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from PUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 1994; 148(1): 81-6.
26. Wylie JL, Worobec EA. Substrate specificity of the high-affinity glucose transport system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol* 1993; 39(7): 722-5.
27. Wylie JL, Worobec EA. The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1995; 177(11): 3021-6.
28. Yoshimura F, Zalman LS, Nikaido H. Purification and properties of *Pseudomonas aeruginosa* porin. *J Biol Chem* 1983; 258(4): 2308-14.