مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و چهارم/شماره‌ی ۳۸۸/هفته‌ی چهارم مرداد ماه ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۳۱

تکثیر و توالی‌یابی بخشی از ژن مسؤول تشکیل خط سفید دفاعی در Pseudomonas aeruginosa با استفاده از Degenerate Polymerase Chain Reaction

محیاسادات لاجوردی[۱]، اعظم قطبی[۱]، فاطمه موسوی[۱]، حسن رکنی‌زاده[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: لیپوپپتیدهای Pseudomonas مانند White line-inducing principle (WLIP)، دارای فعالیت‌های ضد میکروبی حایز اهمیتی می‌باشند. زمانی که باکتری مولد WLIP در مجاورت با Pseudomonas tolaasii کشت داده شود، خط سفید رنگی در بین آن‌ها ایجاد خواهد شد. با شناسایی راهبرد White line reaction (WLR) و بررسی تنوعات آن در انواع مختلف Pseudomonas شاید بتوان از آن به عنوان رویکردی برای درمان بیماری‌های عفونی استفاده کرد. در این مطالعه، با استفاده از تکنیک Degenerated polymerase chain reaction (Degenerate PCR) سعی گردید تا برای اولین بار به طور جزیی سیستم ژنتیک WLR در Pseudomonas aeruginosa شناسایی شود.

روش‌ها: آنالیز دمین آنزیم‌های Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) با استفاده از ابزار Nonribosomal peptide synthetase-Polyketide synthases (NRPS-PKS) انجام شد. همچنین، با به کارگیری برنامه‌ی Geneious الاینمنت چندگانه‌ی توالی DNA، آنالیزهای فیلوژنتیک و بلاست لوکال انجام گردید. در نهایت، DNA ژنومی Pseudomonas aeruginosa LMG 1272 استخراج و Degenerate PCR انجام شد.

یافته‌ها: در ابتدا تکثیر (PCR) بر اساس دمین‌های C1 و TE انجام شد. با وجود تکرارها و تغییرات متعدد، علاوه بر باند مورد نظر، باندهای دیگری نیز به دست آمد. بدین منظور، با استفاده از ژن wlp/wip بلاست بر علیه ژنوم‌های Pseudomonas aeruginosa انجام شد. دو رکورد در دو سویه‌ی Pseudomonas aeruginosa در حدود ۵۰ درصد Identity با ژن wlpB سویه‌ی RW10S2 مشاهده شد. بعد از الاینمنت این دو رکورد با wlpB در RW10S2، طراحی پرایمر و تکثیر انجام شد. با انجام Blastp تنها یک پروتئین به نام Gramicidin D در باکتری Ralstonia solanacearum SD54 با میزان Identity حدود ۴۳ درصد مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: تشکیل خط سفید دفاعی توسط سویه‌ی Pseudomonas aeruginosa به احتمال زیاد توسط یک سیستم ژنتیک متفاوت از آنچه که تاکنون گزارش شده است، انجام می‌شود.

واژگان کلیدی: لیپوپپتید White line-inducing principle، خط سفید دفاعی، انواع Pseudomonas

ارجاع: لاجوردی محیاسادات، قطبی اعظم، موسوی فاطمه، رکنی‌زاده حسن. **تکثیر و توالی‌یابی بخشی از ژن مسؤول تشکیل خط سفید دفاعی در Pseudomonas aeruginosa با استفاده از Degenerate Polymerase Chain Reaction**. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۵؛ ۳۴ (۳۸۸): ۷۳۰-۷۳۶

مقدمه

یکی از راه حل‌های مبارزه با مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک، شناسایی ترکیبات ضد باکتری جدید می‌باشد (۱). باکتری‌های Pseudomonas که در اطراف ریشه‌ی گیاهان زندگی می‌کنند، منبع بسیار غنی برای شناسایی مواد ضد میکروبی جدید از قبیل لیپوپپتیدها می‌باشند (۲). لیپوپپتیدها، به دلیل خصوصیات ضد میکروبی و ضد تومروی، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ترکیبات، متشکل از یک دم اسید چرب و الیگوپپتید کوتاه حلقوی یا خطی می‌باشند (۴-۳).

لیپوپپتیدها توسط سیستم‌های آنزیمی خاصی به نام Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) و مستقل از ریبوزوم‌ها سنتز می‌شوند (۵). یکی از مهم‌ترین این نوع ترکیبات، White line-inducing principle (WLIP) می‌باشد که با تشکیل

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی و نانوفن‌آوری پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و نانوفن‌آوری پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات زیست فن‌آوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: حسن رکنی‌زاده
Email: hassan.roknizadeh@zums.ac.ir

پدیده‌ای جالب به نام خط سفید دفاعی در مقابل باکتری پاتوژن، می‌تواند باکتری هدف را بدون از بین بردن آن مهار نماید (۶).

سیستم ژنتیک سنتز کننده‌ی WLIP، برای اولین بار در باکتری Pseudomonas putida RW10S2 و سپس در باکتری Pseudomonas fluorescens LMG 5329 توسط رکنی‌زاده و همکاران (۷) و Ghequire و همکاران (۸) شناسایی و گزارش شد. این سیستم ژنتیک در Pseudomonas putida شامل سه ژن سنتزی NRPS (به نام‌های wlpA، wlpB و wlpC)، سه ژن سنتز کننده‌ی پروتئین غشایی با عملکرد خروج لیپوپپتید و یک تنظیم کننده از خانواده‌ی luxR برای تنظیم تولید لیپوپپتید می‌باشد. همچنین، در Pseudomonas fluorescens سه ژن NRPS (wipA، wipB و wipC)، یک سیستم ترشحی و یک تنظیم کننده از نوع luxR در تولید WLIP نقش دارد، اما در سطح توالی این دو سیستم ژنتیک با یکدیگر دارای تفاوت قابل توجهی می‌باشند (۹). ماهیت ژن‌های NRPS مادول مانند است و هر مادول، یک اسیدآمینه‌ی خاص را به زنجیره‌ی پپتیدی در حال ساخت اضافه می‌کند (۲).

نتایج سایر مطالعات اولیه نشان داده است که در گونه‌ای متفاوت یعنی Pseudomonas aeruginosa LMG 1272 تشکیل White line reaction (WLR) نیز اتفاق می‌افتد (۱۰). توانایی این گونه، که یک باکتری مهم پاتوژن انسانی است، در تشکیل WLR به ویژه با در نظر گرفتن این که تاکنون هیچ گونه اطلاعاتی در مورد سیستم ژنتیک آن گزارش نشده است؛ بسیار قابل توجه و شناسایی آن بسیار حایز اهمیت است. با شناسایی ژنتیک دقیق راهبرد دفاعی WLR و بررسی تنوع‌های آن در انواع مختلف Pseudomonas، شاید بتوان به نحوه‌ی به کارگیری احتمالی چنین رویکردی برای درمان بیماری‌های عفونی و یا به عنوان روشی مکمل روش‌های موجود نزدیک‌تر شد. در این مطالعه، با استفاده از تکنیک Degenerate polymerase chain reaction (Degenerate PCR) سعی گردید تا نقاطی از ژن‌های NRPS این سویه، تکثیر و توالی‌یابی شود.

روش‌ها

آزمایش تشکیل خط سفید (WLR): این آزمایش، در دو محیط کشت مختلف Trypticase soya agar (TSA) و King's B (KB) و با استفاده از کشت باکتری Pseudomonas مولد تولاسین (Pseudomonas tolaasii) در کنار Pseudomonas aeruginosa به فاصله‌ی حدود ۱ سانتی‌متر در دو دمای ۲۵ و ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد.

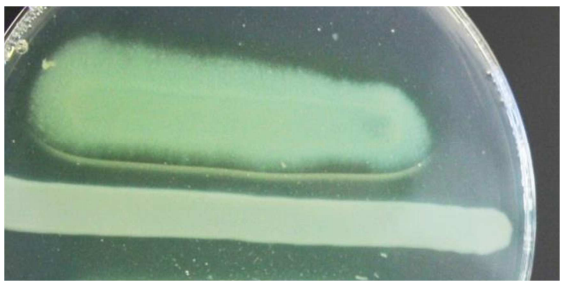
طراحی پرایمر: کلیه‌ی توالی‌های NRPS دخیل در WLR در پایگاه داده با استفاده از blastn و blastx و از طریق ژن‌های WLR سیستم‌های شناخته شده (orf، wlp و wip) استخراج شدند. سپس، با استفاده از Pfam، دمین‌های موجود در ژن‌ها شناسایی شدند. در ابتدا، با استفاده از نتایج Pfam و نیز ابزار پیش‌بینی NRPS دمین‌های TE و C1 شناسایی شد و توالی این دمین‌ها استخراج گردید. با استفاده از الاینمنت چندگانه، توالی‌های این نقاط هم‌ردیف شدند و مورد مقایسه قرار گرفتند. نقاط حفاظت شده برای انتخاب مناسب‌ترین نواحی جهت تکثیر و طراحی پرایمرهای Degenerate مورد استفاده قرار گرفت.

Degenerate PCR: DNA ژنومی با استفاده از کیت سیناژن استخراج و کمیت و کیفیت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی شد. به منظور تعیین دمای Annealing مطلوب برای پرایمرها، PCR گرادیانت انجام شد. محصولات با الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد رنگ‌آمیزی شده با ژل رد و Ladder (۱۰۰ bp–۳ kbp) مورد بررسی قرار گرفت. باند مورد نظر، با استفاده از کیت Accu Prep PCR purification kit خالص‌سازی و برای توالی‌یابی ارسال شد.

واکاوی مقایسه‌ای In silico بر روی توالی ژنی به دست آمده انجام شد. با استفاده از Neighbor joining، درخت فیلوژنتیک جهت بررسی قرابت و موقعیت این ژن‌ها با سایر سیستم‌های سنتز لیپوپپتید شناخته شده، با استفاده از نرم‌افزار Geneious (6.0.6) ترسیم گردید.

یافته‌ها

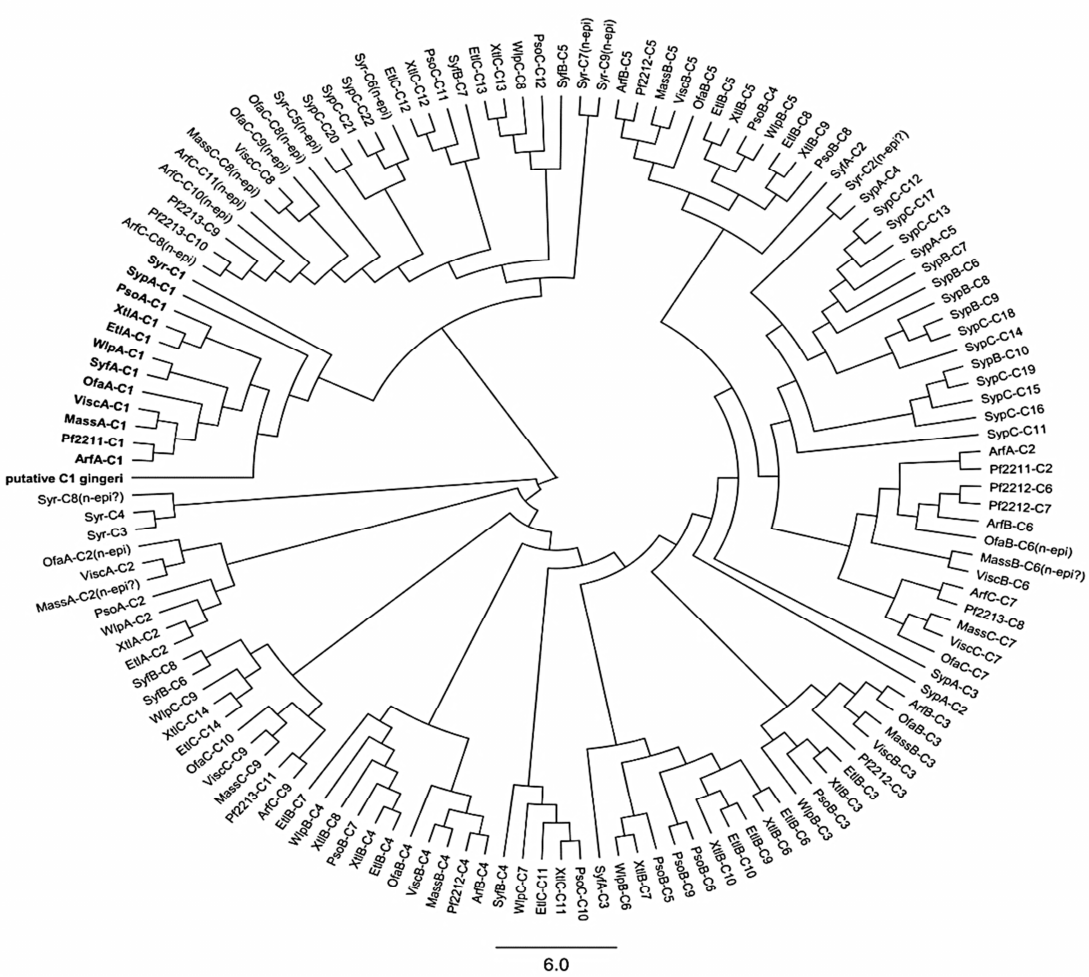
هدف از انجام این مطالعه، شناسایی بخشی از ژن‌های NRPS مربوط به WLR در Pseudomonas aeruginosa می‌باشد. به منظور تأیید قابلیت این باکتری در تولید خط سفید دفاعی، آزمایش WLR انجام شد و همان گونه که شکل ۱ نشان می‌دهد، تولید خط سفید توسط این سویه مشاهده گردید.



شکل ۱. خط سفید دفاعی به دست آمده از تعامل Pseudomonas aeruginosa LMG1274 با Pseudomonas tolaasii سویه‌ی CH36 در محیط Trypticase soya agar (TSA)

جهت بررسی سیستم تولید خط سفید در این سویه ابتدا بر اساس مطالعات پیشین همین گروه دمین های C1 و TE به عنوان مناسب ترین دمین ها انتخاب شد (۱۱). زیرا ژن‌های NRPS علاوه بر لیپوپپتیدها، مسؤول سنتز تعدادی از متابولیت‌های غیر لیپوپپتیدی نظیر ترکیبات سیدروفور می‌باشند و لازم به ذکر است که همه‌ی باکتری‌های Pseudomonas fluorescens از قابلیت تولید ترکیبات سیدروفور برخوردار هستند. با توجه به این که به تازگی لیپوپپتیدهای جدید و متعددی شناسایی و در پایگاه داده به ثبت رسیده‌اند، آنالیز مقایسه‌ای دمین‌های C و TE دوباره انجام شد.

همان‌طور که در شکل ۲ مشخص شده است، از بین تمامی دمین‌های C لیپوپپتیدهای مختلف، تنها دمین C1 لیپوپپتیدها در یک خوشه قرار گرفته‌اند که این امر، نشان دهنده‌ی تفاوت این دمین از سایر دمین‌های C می‌باشد. از این رو، در صورت طراحی پرایمر بر اساس این دمین، احتمال اتصال آن به دیگر دمین‌های C پایین خواهد بود. از طرفی، NRPSهای لیپوپپتیدی اغلب در انتهای ژن خود دارای دو دمین TE (TE1 و TE2) می‌باشند که در NRPS از نوع سیدروفور وجود ندارند. از این رو، این دمین‌ها می‌توانند در کنار دمین C1 هدف مناسبی برای تکثیر NRPS لیپوپپتیدی باشند. بنا بر این، در مطالعه‌ی حاضر، ابتدا این دمین‌ها به عنوان هدف اولیه جهت طراحی پرایمر در نظر گرفته شدند. بر روی توالی دمین‌های C1 و TE، سویه‌های Pseudomonas protegens Pf-5، Pseudomonas CMR12a، Pseudomonas fluorescens LMG 5329، Pseudomonas gingeri و Pseudomonas putida RW10S2 (همگی مولد WLR می‌باشند) الاینمنت چندگانه انجام شد و توالی‌های پیش‌گفته، برای یافتن نواحی حفاظت شده، مورد مقایسه قرار گرفت و سپس پرایمرهای HRZ1: AITCKCCGITSTAYAMYATCGG، HRZ2: CCCCAGCCRTCGAGGATCAGGTG، HRZ11: CGCMTGRYCGACCAGGGCAAGGC و HRZ12: ACCCAGCCRCCRAASGARTGSCC طراحی شد.



شکل ۲. آنالیز مقایسه‌ای دمین‌های C از ژن‌های Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) مربوط به Pseudomonas

در شروع، به منظور تخمین دمای Annealing مناسب با استفاده از پرایمرهای HRZ1 و HRZ2 گرادیانت PCR برای سه دمای ۵۷، ۵۸/۱ و ۵۹ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. نتایج، نشان دهنده‌ی حضور تعدادی باند غیر اختصاصی علاوه بر باند اصلی بود. از این رو، افزایش پارامتر دما در دستور کار قرار گرفت. طی آزمایش‌های متعدد بعدی PCR در چندین دما (۶۵-۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) انجام شد، اما به همراه باند مورد نظر، حضور باندهای غیر اختصاصی نیز قابل توجه بود.

رویکرد دیگر جهت حذف باندهای غیر اختصاصی، کاهش میزان DNA بود که تغییری در نتایج حاصل نشد. پرایمرهای طراحی شده برای دمین TE (HRZ11 و HRZ12) نیز مورد بررسی قرار گرفتند. با وجود به کارگیری گرادیانت PCR، هیچ باندی ملاحظه نشد. از این رو، راهبرد دیگری به کار برده شد. بدین منظور، با استفاده از ژن wlpA/wipA بلاست بر علیه ژنوم‌های Aeruginosa انجام شد. همان‌طور که می‌دانیم به تازگی، طرح ۱۰۰۰ ژنوم Aeruginosa در دنیا انجام شده است که در آن، ژنوم حدود ۱۰۰۰ سویه‌ی Aeruginosa به طور کامل توالی‌یابی شد.

از این رو، با توجه به تعداد بالای این باکتری انتظار می‌رود ارتولوگ ژن‌های wlp/wip (و یا حتی orf) در این ژنوم‌ها مشاهده شود. بنا بر این، با استفاده از این ژن‌ها بر علیه ژنوم‌های Aeruginosa، BlastX انجام شد و در لیست نتایج، تنها دو رکورد دارای حدود ۵۰ درصد Identity با ژن wlpB سویه‌ی RW10S2 مشاهده شد. میزان پایین Identity بدان معنا می‌باشد که سیستم ژنتیک مولد خط سفید دفاعی در Aeruginosa، بسیار متفاوت از موارد شناخته شده است.

نتایج Degenerate PCR (پرایمرها بر اساس ژن‌های مولد خط سفید دفاعی در سیستم‌های شناخته شده بود) نیز مؤید همین موضوع می‌باشد؛ چرا که قطعه‌ی مورد نظر، به طور اختصاصی تکثیر نیافت. در ادامه، جهت پیدا کردن و تکثیر ژن احتمالی مولد خط سفید دفاعی در Aeruginosa، ابتدا این دو رکورد مربوط به ژن‌های NRPS در Aeruginosa با wlpB RW10S2 الاین شد و منطقه‌ی مناسب با حداکثر حفاظت شدگی جهت طراحی پرایمر انتخاب گردید. با توجه به میزان حفاظت شدگی بالا، پرایمر Forward اختصاصی طراحی گردید، اما برای پرایمر معکوس در ۴ نقطه تفاوت توالی دیده شد. از آن جایی که میزان GC در ژنوم Aeruginosa بسیار بالا (بیش از ۶۷ درصد) می‌باشد، تکثیر قطعه‌ی هدف حتی با پرایمر اختصاصی مشکل خواهد بود و این مسأله، با وجود Degenerate بودن پرایمرها، بسیار حادتر می‌باشد. از این رو، در مورد پرایمر معکوس نیز سعی شد تا حد امکان Degeneracy حذف گردد و در صورت عدم موفقیت در تکثیر، پرایمر طراحی شده تغییر یابد. پرایمرها به شرح HRZ13: CGCATCGAGCTGGGCGAGATCG، HRZ14: CCTTGCGGTCGAGCTTGCCGTTG و HRZ15: CCTTGCGGTCGAGCTTGCCATTG بود.

با استفاده از این پرایمرهای جدید PCR در دمای ۶۴/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و تعداد ۳۸ چرخه انجام شد که در نتیجه‌ی آن، باند مورد نظر (۳۰۰ bp) ملاحظه گردید. قطعه‌ی مورد نظر، خالص‌سازی و سپس توالی‌یابی شد. با استفاده از Blastp تنها یک پروتئین به نام گرامیسیدین D در باکتری Ralstonia solanacearum SD54 با میزان Identity حدود ۴۳ درصد به دست آمد. گرامیسیدین، از ترکیبات پپتیدی دارای خاصیت آنتی‌بیوتیک می‌باشد که از باکتری‌های Bacillus brevis موجود در خاک به دست می‌آید (۱۲).

بحث

جهت شناسایی جزیی از سیستم ژنتیک Pseudomonas aeruginosa، از تکنیک Degenerate PCR استفاده شد. کاربرد این تکنیک برای مواقعی می‌باشد که توالی ژن موجود نیست؛ از این رو، طراحی پرایمر Degenerate بر اساس الاینمنت ژن‌های ارتولوگ موجود در پایگاه داده صورت می‌گیرد (۸). به منظور شناسایی ژن‌های NRPS، دو راهبرد وجود دارد: راهبرد اول، طراحی پرایمرهای Degenerate بر اساس توالی‌های اسید آمینه‌ای حفاظت شده‌ی دمین‌های آدنیلاسیون و تیولاسیون NRPS می‌باشد. این راهبرد، بر اساس ترجمه‌ی عقب‌گرد (Back translation) (ترجمه‌ی معکوس از پروتئین به DNA) توالی‌های حفاظت شده می‌باشد. Tapi و همکاران، از این روش در سویه‌های مختلف Bacillus بهره بردند. آن‌ها از دو سری پرایمر Degenerate جهت تکثیر موتیف‌های حفاظت شده در کلاسترهای بیوسنتزی NRPS سه خانواده‌ی لیپوپپتیدی استفاده کردند. نتایج این بررسی، نه تنها نشان دهنده‌ی حضور ژن‌های مورد انتظار در سویه‌های Bacillus بود؛ بلکه ژن‌های دیگری نیز در Bacillus. subtilis، Bacillus. thuringiensis و Bacillus. cereus شناسایی شدند (۱۳).

در راهبرد دوم، طراحی پرایمرهای Degenerate بر اساس مناطق حفاظت شده‌ای می‌باشد که با هم‌ردیف کردن توالی‌های نوکلئوتیدی دمین‌های آدنیلاسیون ژن‌های NRPS به دست می‌آیند. Rajendran با به کارگیری پرایمرهای طراحی شده بر اساس مناطق حفاظت شده‌ی دمین‌های آدنیلاسیون و تیولاسیون در Bacillus. subtilis موفق به شناسایی یک لوکوس ژنی جدید در Pseudomonas fluorescens شد (۱۴). Ayuso-Sacido و Genilloud، در بیش از ۲۱۰ سویه‌ی مختلف، از اکتینومیست‌ها فراوانی گسترده‌ی توالی‌های ژنی مشابه با Polyketide synthase-I (PKS-I) و

Nonribosomal peptide synthetase- s (NRPS) را نشان دادند. همچنین، این گروه با به کارگیری پرایمرهای ویژه‌ی دمین‌های آدنیلاسیون قادر به شناسایی ژن‌های NRPS در باکتری‌هایی گردید که پیش از این، تولید کننده‌ی ترکیبات ضد میکروبی محسوب نمی‌شدند (۱۵).

در تأیید این یافته‌ها، Palomo و همکاران چندین سویه از اکتینومیست‌های دریایی را به عنوان منابع جدید تولید محصولات زیستی مورد بررسی قرار دادند (۱۶). به منظور ارزیابی توان بیوسنتزی سویه‌ها، غربالگری PCR برای ژن‌های سنتز کننده‌ی متابولیت‌های ثانویه انجام گردید. پرایمرهای Degenerate PCR بر اساس دمین‌های آدنیلاسیون NRPS طراحی شدند. این مطالعه، برای اولین بار به بررسی فراوانی سیستم‌های بیوسنتزی مسؤول تولید ترکیبات زیستی جدید توسط باکتری‌های خانواده‌ی Micrococcaceae پرداخت. در این بررسی، سه ایزوله‌ی مختلف شناسایی شدند که قادر به تولید آنتی‌بیوتیک جدید تحت عنوان Kocurin بودند. نتایج این بررسی نشان دهنده‌ی آن است که محیط‌های دریایی به ویژه اسفنج‌ها، منبع تولید کننده‌های متابولیت‌های زیستی جدید و دارای کاربرد بیوتکنولوژی می‌باشند.

همچنین، Tambadou و همکاران با به کارگیری Degenerate PCR به بررسی مجموعه‌ای از ۱۰۰ ایزوله‌ی باکتری آبی در معرض جزر و مد پرداختند. در این مطالعه نیز طراحی Degenerate پرایمرها بر اساس توالی‌های حفاظت شده‌ی دمین‌های A انجام شد. سویه‌های باکتری، از نظر وجود ژن‌های NRPS و تولید ترکیبات ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند و در نهایت، این محققین موفق به شناسایی توالی‌های NRPS جدید در این باکتری‌ها شدند (۱۷). بنا بر این، Degenerate primer PCR امکان شناسایی ژن‌های جدید را در گروه‌های تولید کننده‌ی ناشناخته فراهم می‌آورد.

رکنی‌زاده و همکاران، راهبرد دیگری را برای یافتن ژن‌های مولد لیپوپپتیدهای جدید معرفی نمودند. در این روش، با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیک گسترده، پیش‌بینی شد که بهترین دمین برای هدف قرار دادن NRPSهای لیپوپپتیدی، دمین C1 و TE می‌باشد و با طراحی پرایمرهای Degenerate و بررسی چندین سویه صحت این پیش‌بینی در عمل مورد تأیید قرار گرفت (۱۱).

با توجه به شناسایی لیپوپپتیدهای جدید آنالیزهای بیوانفورماتیک مقایسه‌ای دمین‌های C و TE بار دیگر در این مطالعه انجام شد. آنالیز مقایسه ای دمین C در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس شکل ۲، فقط دمین C1 لیپوپپتیدهای مختلف در یک خوشه قرار گرفتند که این امر، نشان دهنده‌ی تمایز این دمین از سایر دمین‌های C می‌باشد.

بنا بر این، با طراحی پرایمر بر اساس این دمین، می‌توان مانع از تکثیر ژن های NRPS ترکیبات غیر لیپوپپتیدی مانند پیووردین، دمین های A، Peridinin-chlorophyll-protein (PCP) و سایر دمین های C گردید که این امر، در تکثیر صحیح ژن های NRPS با توجه به ماهیت تکراری آن‌ها بسیار حایز اهمیت است و با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد (۱۱).

پرایمرهای اولیه‌ی مطالعه‌ی حاضر، بر اساس دمین‌های پیش‌گفته طراحی شدند، اما قادر به تکثیر ژن هدف نبودند که این امر، بر وجود یک سیستم بسیار متمایز در این سویه دلالت می‌کند. یکی از دلایل انتخاب سویه‌ی Aeruginosa برای این مطالعه از بین سویه‌های جدید مولد خط سفید دفاعی، مفروض بودن وجود یک سیستم بسیار متمایز در این سویه بود.

نتایج اولیه‌ی مطالعه‌ی حاضر نیز همین فرضیه را تأیید می‌نماید. از طرفی، با توجه به این که ژنوم Aeruginosa غنی از CG می‌باشد، استفاده از PCR جهت تکثیر قطعات ژنی آن به خصوص در نواحی تکراری مانند ژن‌های NRPS امری چالش برانگیز می‌باشد و این مشکل با Degenerate بودن پرایمرها تشدید می‌شود.

جهت تکثیر قطعه‌ای از NRPS این سویه، راهبرد دیگری یعنی استفاده از ژنوم‌های توالی‌یابی شده‌ی طرح ۱۰۰۰ ژنوم Aeruginosa بود (۱۸). آنالیزهای این مطالعه، نشان داد که قطعه‌ی مناسب برای تکثیر این ژن‌ها در این سویه، ارتولوگ ژن wlpB می‌باشد. با طراحی پرایمر و PCR قطعه‌ی مورد نظر تکثیر و توالی‌یابی شد. با انجام Blastp، تنها یک پروتئین به نام گرامیسیدین D در باکتری Ralstonia solanacearum SD54 مشاهده شد. این امر، نشانگر وجود اطلاعات بسیار ناچیز درباره‌ی این نوع لیپوپپتید سنتز شده توسط Pseudomonas aeruginosa و ضرورت بررسی‌ها و مطالعات بیشتر می‌باشد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تشکیل خط سفید دفاعی توسط این سویه، به احتمال زیاد توسط یک سیستم ژنتیک متفاوت از آن چه که تاکنون گزارش شده است، انجام می‌شود. از این رو، در قدم بعدی توالی‌یابی کل ژنوم این سویه با استفاده از Next generation sequencing ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی تحقیقاتی محیاسادات لاجوردی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی (A-12-835-7)، مصوب دانشگاه علوم پزشکی زنجان می‌باشد.

References

1. Reardon S. WHO warns against 'post-antibiotic' era. Nature [Online]. [cited 2014 Apr 30]; Available from: URL: http://www.nature.com/news/who-warns-against-post-antibiotic-era-1.15135.
2. Gross H, Loper JE. Genomics of secondary metabolite production by Pseudomonas spp. Nat Prod Rep 2009; 26(11): 1408-46.
3. Raaijmakers JM, de Bruijn I, Nybroe O, Ongena M. Natural functions of lipopeptides from Bacillus and Pseudomonas: more than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiol Rev 2010; 34(6): 1037-62.
4. Li W, Rokni-Zadeh H, de Vleeschouwer M, Ghequire MG, Sinnaeve D, Xie GL, et al. The antimicrobial compound xantholysin defines a new group of Pseudomonas cyclic lipopeptides. PLoS One 2013; 8(5): e62946.
5. Rottig M, Medema MH, Blin K, Weber T, Rausch C, Kohlbacher O. NRPSpredictor2--a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. Nucleic Acids Res 2011; 39(Web Server issue): W362-W367.
6. Wong WC, Preece TF. Identification of Pseudomonas tolaasi: the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. J Appl Bacteriol 1979; 47(3): 401-7.
7. Rokni-Zadeh H, Li W, Sanchez-Rodriguez A, Sinnaeve D, Rozenski J, Martins JC, et al. Genetic and functional characterization of cyclic lipopeptide white-line-inducing principle (WLIP) production by rice rhizosphere isolate Pseudomonas putida RW10S2. Appl Environ Microbiol 2012; 78(14): 4826-34.
8. Ghequire MG, Rokni-Zadeh H, Zarrineh P, de Mot R. Draft genome sequence of pseudomonas fluorescens LMG 5329, a white line-inducing principle-producing bioindicator for the mushroom pathogen Pseudomonas tolaasii. Genome Announc 2013; 1(4): e00383-13.
9. Rokni-Zadeh H, Li W, Yilma E, Sanchez-Rodriguez A, de Mot R. Distinct lipopeptide production systems for WLIP (white line-inducing principle) in Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida. Environ Microbiol Rep 2013; 5(1): 160-9.
10. Munsch P, Alatossava T. The white-line-in-agar test is not specific for the two cultivated mushroom associated pseudomonads, Pseudomonas tolaasii and Pseudomonas "reactans". Microbiol Res 2002; 157(1): 7-11.
11. Rokni-Zadeh H, Mangas-Losada A, de Mot R. PCR detection of novel non-ribosomal peptide synthetase genes in lipopeptide-producing Pseudomonas. Microb Ecol 2011; 62(4): 941-7.
12. Andersen OS, Koeppe RE, Roux B. Gramicidin channels. IEEE Trans Nanobioscience 2005; 4(1): 10-20.
13. Tapi A, Chollet-Imbert M, Scherens B, Jacques P. New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in Bacillus strains by polymerase chain reaction. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 85(5): 1521-31.
14. Rajendran N. Identification and cloning of a gene locus encoding peptide synthetase of Pseudomonas fluorescens by two sets of PCR primers. Z Naturforsch C 1999; 54(1-2): 105-9.
15. Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. Microb Ecol 2005; 49(1): 10-24.
16. Palomo S, Gonzalez I, de la Cruz M, Martin J, Tormo JR, Anderson M, et al. Sponge-derived Kocuria and Micrococcus spp. as sources of the new thiazolyl peptide antibiotic kocurin. Mar Drugs 2013; 11(4): 1071-86.
17. Tambadou F, Lanneluc I, Sable S, Klein GL, Doghri I, Sopena V, et al. Novel nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes sequenced from intertidal mudflat bacteria. FEMS Microbiol Lett 2014; 357(2): 123-30.
18. Freschi L, Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Boyle B, Dupont MJ, Laroche J, et al. Clinical utilization of genomics data produced by the international Pseudomonas aeruginosa consortium. Front Microbiol 2015; 6: 1036.

Journal of Isfahan Medical School

Vol. 34, No. 388, 4th Week, August 2016

Received: 09.04.2016

Accepted: 20.06.2016

Partial Amplification and Sequencing of Gene Involved in Formation of Defensive White Line Reaction in Pseudomonas aeruginosa Using Degenerate Polymerase Chain Reaction

Mahya Sadat Lajevardi[1], Azam Ghotbi[1], Fatemeh Mousavi[1], Hassan Rokni-Zadeh[2]

Original Article

Abstract

Background: Pseudomonas lipopeptides such as white line-inducing principle (WLIP) have important antimicrobial activities. When a WLIP producer bacterium is grown close to P. tolaasii, a white line precipitate will be formed between them Identification of white line reaction (WLR) defense strategy and its distribution among different pseudomonads might help to use such an approach for the treatment of infectious diseases In current study, through a degenerate polymerase chain reaction (PCR) method, the partial characterization of genetic system of NRPS-based WLR was attempted in Pseudomonas aeruginosa for the first time in the world.

Methods: Domain analysis of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) enzymes was performed by the nonribosomal peptide synthetase-Polyketide synthases (NRPS-PKS) tool. Multiple DNA sequence alignments, phylogenetic analyses and local Blast searches were performed by Geneious Pro. The gDNA was extracted from P. aeruginosa LMG 1272 and degenerate PCR was carried out.

Findings: First, PCR amplification based on the C1 and TE domains was performed. Despite trying several modifications, a number of bands were obtained in addition to our expected band. For this purpose, the gene wlp/wip blast against Pseudomonas aeruginosa genomes was performed. Two homologes with about 50% identity to wlpB in RW10S2 were obtained. New primers were designed by which the target fragment could be amplified whose Blastp identified only one protein in bacterium Ralstonia solanacearum SD54 with the identity of about 43%.

Conclusion: This study shows that the defensive white line formation by P. aeruginosa is governed most likely by a genetic system different from what has been reported before.

Keywords: White line-inducing principle (WLIP) Lipopeptide, White line reaction (WLR), Pseudomonads

Citation: Lajevardi MS, Ghotbi A, Mousavi F, Rokni-Zadeh H. **Partial Amplification and Sequencing of Gene Involved in Formation of Defensive White Line Reaction in Pseudomonas aeruginosa Using Degenerate Polymerase Chain Reaction.** J Isfahan Med Sch 2016; 34(388): 730-6.

1- MSc Student, Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, School of Medicine, AND Zanjan Pharmaceutical Biotechnology Research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Hassan Rokni-Zadeh, Email: hassan.roknizadeh@zums.ac.ir