تحول بعض الصفات المحمولة على بلازميدات بكتريا *Staphylococcus aureus* إلى السلالة *E. coli* BL21(DE3)

حارث كامل بنية

كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة الأنبار

الخلاصة

تضمنت الدراسة التعرف على بعض الصفات الوراثية المحمولة على البلازميدات لبكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات التهاب المجاري البولية. اظهر فحص مقاومة المضادات الحياتية ان البكتريا المعزولة كانت مقاومة لكل من (AM, CIP, MET, TMP, B, RA) وحساسة للمضادات (TOB, C, TE) وكانت العزلة محللة للدم من نوع بيتا ومحللة لبروتين الكازائين. كانت نتيجة الترحيل الكهربائي للدنا *S. aureus* البلازميدي ظهور ثلاث حزم. استخدم الدنا المعزول في عملية التحول الوراثي إلى السلالة *E.coli* BL21(DE3) الحساسة لكل المضادات الحياتية المستخدمة في الدراسة باستثناء (RA) وليس لها القدرة على على تحليل الدم والكازائين، أظهرت نتائج التحول قدرة خلايا *E. coli* المتحولة على إنتاج الهيمولايسين وانتقلت للخلايا صفة المقاومة للمضادات (AM, MET, TMP, B) ولم تظهر للخلايا المتحولة القدرة على تحليل الكازائين، وبينت نتيجة الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي المعزول من الخلايا المتحولة ان لهذه الخلايا نفس النسق البلازميدي لخلايا *S. aureus*.

Transformation of some genetic traits carried on *Staphylococcus aureus* plasmids to *E. coli* BL21(DE3) strain

H. K. Buniya

College of Education for Pure Sciences\ University of Anbar

Abstract

This study included identified some of the genetic traits carried on plasmids for *Staphylococcus aureus* isolated from urinary infections cases. The test of antibiotic resistance appears the isolated bacteria was resistance for each of the (AM, CIP, MET, TMP, B, RA) and sensitive for (TOB, C, TE), also it was beta heamolytic on blood agar and able to lysis of casein protein. The electrophoresis showed three bands of *S. aureus* DNA plasmids. The isolated plasmids used in the transformation process to *E. coli* BL21(DE3) strain, this strain sensitive for all antibiotic used in this study except (RA) and it was not able to lysis of blood and casein protein. The result of transformation showed ability of transformant*E.coli* to produce the heamolysin and became resistance for (AM, MET, TMP, B) but it was not lysis of casein. The transformant*E. coli* has same plasmid pattern for *S. aureus.*

المقدمة

تضم المكورات العنقودية Staphylococci أنواعا عديدة من البكتريا الممرضة للإنسان والحيوان على حد سواء، وتعد *Staphylococcus aureus* من أهم الأنواع الممرضة للإنسان وأكثرها شيوعاً عل الرغم من أنها تشكل كذلك جزءا من الأحياء المجهرية الطبيعية المتواجدة في أجزاء مختلفة من الجسم مثل الجلد والمجاري التنفسية (1) غير أنها تعتبر من أكثر الأنواع التابعة لجنس المكورات العنقودية أهمية من الناحية السريرية، فهي مسؤولة عن مدى واسع من الأمراض مثل الدمامل، والحصف وخراجات الجروح الناتجة عن العمليات الجراحية، والتهابات الجلد والأنسجة الرخوة والعظام والمفاصل والتهاب الرئة القصبي، والتهاب الأجزاء

الداخلية للقلب، وكذلك التسمم الغذائي (2). تعود إمراضيه هذه البكتريا وقدرتها على غـزو نسـيج المضـيف وانتشارها فيه إلى امتلاكها الكثير من عوامل الضراوة كالمحفظة التي تساعد في مقاومة البكتريا لعملية البلعمة، بالإضافة إلى امتلاكها جدار الخلية الذي يعمل على مقاومة الجهاز المناعي للمضيف (3، 4)، كما تمتلك بعض السلالات طبقة مخاطية تسهل عملية الالتصاق، والاستيطان للخلية البكتيرية مع خلايا المضيف، فضـلاً عـن قدرتها على إنتاج العديد من الذيفانات والأنزيمات خارج خلوية التي تساعد البكتريا في إحداث الإصـابة. مثـل الأنزيم المختر لبلازما الدم الذي يمتلك القدرة على تثبيط عملية البلعمة، ولها القدرة على إنتاج أنزيمات أخـرى تمثل عوامل انتشار (Spreading factors) مثل أنزيم الستافيلوكاينيز، والبروتينيز، واللايبيز التي تسـهم فـي غزو البكتريا للأنسجة، وانتشار الخمج، وتعمل على إنتاج ذيفانات محللة للدم نوع ألفا وبيتا وكاما ودلتـا، إلـى جانب إنتاجها ذيفانات معوية مسببة تسمماً غذائياً (5). تحتوي *S. aureus* كباقي أنواع البكتريا الأخرى علـى عناصر وراثية تسمى البلازميدات Plasmids تكون بشكل تراكيب حلقية دائرية من شريط مزدوج للـ DNA بإمكانها التضاعف بصورة مستقلة عن الكروموسوم البكتيري ولها القابلية على ان تتوارث بثبات وتنتشر بشكل واسع في خلايا البكتريا المختلفة (6). تختلف البلازميدات في أوزانها الجزيئية من اقل من كيلو دالتون الى أكثر من 200 كيلو دالتون، وجودها غير ضروري لحياة المضيف الا إن وجودها يعطي للمضيف صفات إضـافية تمكنه من العيش في ظروف استثنائية. ومن أهم الصفات التي تشفر لها الجينات المحمولة على البلازميد هـي :مقاومة المضادات الحياتية، إنتاج الهيمولاسين والسايدروفورات، مقاومة المعادن الثقيلة، تخميـر السـكريات، إنتاج بعض الإنزيمات المسئولة عن تفكيك المركبات المعقدة مثل المبيدات والنفط وتخليق الذيفانات البكتيريـة، وقد لا يكون للبلازميدات أي اثر على الصفات التي تظهر على الخلية البكتيريـة وفـي هـذه الحالـة تسـمى البلازميدات الخفية Cryptic plasmids ويستدل على وجودها فقط عند عزل الدنا البلازميدي (7، 8). تهدف الدراسة الحالية إلى معرفة دور البلازميدات في حمل صفة مقاومة المضادات الحياتية وإنتـاج الهيمولايسـين وإنتاج البروتين المحلل للكازين من بكتريا *S. aureus* المعزولة من مستشفى الرمادي التعليمي.

المواد وطرائق العمل

- **جمع النماذج:** جُمعت خمسة عزلات من بكتيريا *S. aureus* من مختبرات مستشفى الرمادي العـام فـي مدينة الرمادي ومن حالات التهاب للمجاري البولية وتم الاعتماد على تشخيص المختبر فـي تحديـد نـوع البكتريا مع إجراء بعض الفحوصات التأكيدية في المختبر، حيث نميت البكتريا على وسط المانيتول الملحي الصلب وملاحظة شكل الخلايا وترتيبها واكتسابها لصبغة كرام من عدمه. أمـا السـلالة *E. coli* BL 21 (DE3) فتم الحصول عليها من مركز التقانة الاحيائية في جامعة آنا/ الهند.
- **اختبار تحلل الدم:** زرعت العزلات على وسط اكار الدم الصلب وحضنت الأطباق مدة 24 ساعة وبدرجـة حرارة 37 مئوية. ظهور مناطق تحلل (Hemolysis) تحيط بالمستعمرات البكتيرية تشـير الـى ايجابيـة الاختبار (9).
- **عزل البلازميدات:** اعتمدت طريقة التحلل القاعدي Alkaline lysis method الموصوفة مـن قبـل (10) لعزل البلازميدات من بكتريا *S. aureus* المستخدمة في الدراسة.
- **التحول الوراثي:** اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (11) لتحضير الخلايـا المؤهلـة competent cells للسلالة *E. coli* BL (21) DE3 والتحول الوراثي باستخدام دنا البلازميدي المعزول من بكتريا *S. Aureus* وباستخدام كلوريد الكالسيوم.

- **اختبار تحلل الكازائين:** لمعرفة قدرة البكتريا على تحليل بروتين الكازائين تم الاعتماد على فحص Caesinolytic assay وحسب ما موصوف في (12).
- **اختبار حساسية المضادات الحياتية:** أُجري اختبار مقاومة المضادات الحياتية بطريقة الأقراص وحسب ما مذكور في (13) للتعرف على مدى حساسية العزلات البكتيرية التي هي قيد الدراسة للمضادات الحياتية باستخدام مجموعة من أقراص المضادات الحياتية المجهزة من قبل شركة Bioanalyse (الجدول 1).

الجدول(1) أقراص المضادات الحياتية المستخدمة في اختبار الحساسية وتركيزها

المضاد الحياتي	الرمز	تركيز المضاد mg/ قرص
Ampicillin	Am	10
Tobramycin	TOB	10
Chloramphenicol	C	30
Ciprofloxacin	Cip	5
Methicillin	MET	5
Trimethoprim	TMP	30
Bacitracin	B	10
Rifampin	RA	5
Tetracyclin	TE	30

النتائج والمناقشة

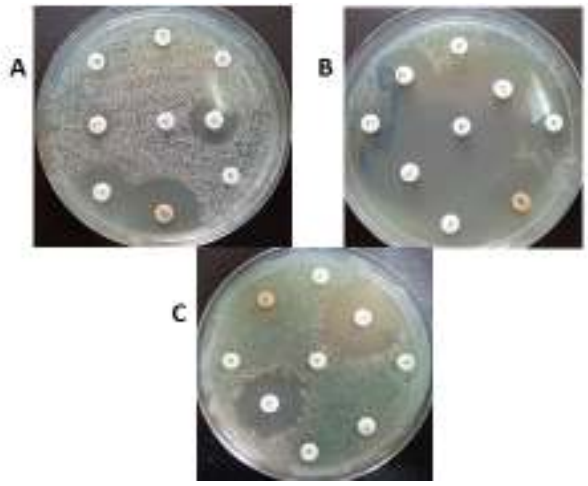
- **العزل والتشخيص:** تم الحصول على عزلات من *S. aureus* وتشخيصها في مختبرات المستشفى، وأجريت بعض الفحوصات للتأكد من نوع العزلات. حيث تم زرع العينات في وسط الدم الصلب للحصول على مستعمرات نموذجية، وكانت المستعمرات ناعمة، مرتفعة قليلاً، لامعة، ومحاطة بهالة تحلل على وسط اغار الدم نتيجة لتحليلها الكامل للدم من نوع بيتا (β) (شكل 3 – A)، كما ظهرت المستعمرات النامية على وسط المانيتول الملحي الصلب باللون الأصفر، والأصفر الشاحب، والذهبي، بالإضافة إلى تغير لون الوسط إلى اللون الأصفر نتيجة لقدرتها على تخمير سكر المانيتول. وتم اجراء الاختبارات التالية في الدراسة على عزلة واحدة تم انتخابها على بالاعتماد على قُطر هالة تحلل الدم المحيطة بالمستعمرة.
- **اختبار حساسية المضادات الحياتية:** تم إجراء اختبار حساسية المضادات الحياتية للعزلة المدروسة باستخدام طريقة الانتشار، ويُظهر الجدول (2) والشكل (1 – A) نتائج الاختبار.

جدول (2) نتائج اختبار الحساسية الدوائية تجاه البكتيريا المستخدمة في الدراسة

المضاد الحياتي	*S. aureus*	*E. coli* BL21(DE3)	*E.coli* BL21 المتحولة
Ampicillin	-	+	-
Tobramycin	+	+	+
Chloramphenicol	+	+	-
Ciprofloxacin	-	+	+
Methicillin	-	+	-
Trimethoprim	-	+	-
Bacitracin	-	+	-
Rifampin	-	-	-
Tetracyclin	+	+	-

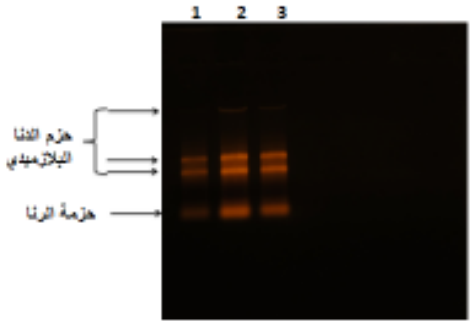
+: حساس

–: مقاوم



شكل (1) نتائج اختبار الحساسية الدوائية تجاه البكتريا المستخدمة في الدراسة. A: *S. aureus*, B: *E.coli* BL21(DE3) ،C: *E.coli* BL21(DE3) المتحولة .

- **عزل الدنا البلازميدي:** استخدمت طريقة التحلل القاعدي Alkaline Lysis لعزل الدنا البلازميدي، وتعد هذه الطريقة واحدة من عدة طرق مستخدمة لهذا الغرض والتي تم تطويرها من قبل الباحثين، وهي من الطرق الشائعة وذلك لسهولتها ولكونها قليلة التكلفة. وتعتمد هذه الطريقة على مبدأ رفع قيمة الرقم الهيدروجيني للوسط إلى 12 – 12.5 باستخدام هيدروكسيد الصوديوم، ولكون *S.aureus* هي موجبة لصبغة كرام فقد تم استخدام إنزيم اللايسوزايم (50 ملغم/ مل) للحصول على تحلل كامل لجدران الخلايا البكتيرية، ومع رفع قيمة الرقم الهيدروجيني يتم تحليل الخلايا البكتيرية ومسخ الدنا الكروموسومي (قليل الالتفاف) وكذلك مسخ البروتينات وتحطيم الخلايا ومن ثم خفض الرقم الهيدروجيني مرة أخرى باستخدام خلات البوتاسيوم مما يؤدي إلى تكتل البروتينات والدنا الكروموسومي وتترسب بفعل الطرد المركزي ووجود SDS ويتم التخلص منها في حين ان جزئيات الدنا البلازميدي تكون عالية الالتفاف وصغيرة الحجم تعود إلى شكلها الأصلي بعد خفض الرقم الهيدروجيني للمحلول وتبقى بشكل ذائب في المحلول الرائق بعد الطرد المركزي ويتم ترسيبها بفعل الـ Isopropanol ومن ثم إعادة إذابتها بمحلول الـ TE (14). يوضح الشكل (2) نتيجة الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي لبكتريا *S. aureus* (شكل 2–1) ولاثنين من بكتريا *E. coli* المتحولة (شكل 2– 2 و2– 3) حيث نلاحظ ظهور ثلاث حزم من الدنا البلازميدي قد تمثل ثلاث أشكال فيزيائية مختلفة لنوع واحد من البلازميدات أو أكثر من نوع البلازميدات بأوزان جزيئية مختلفة تؤدي إلى ظهور حزم متعددة عند ترحيلها على هلام الاكاروز.

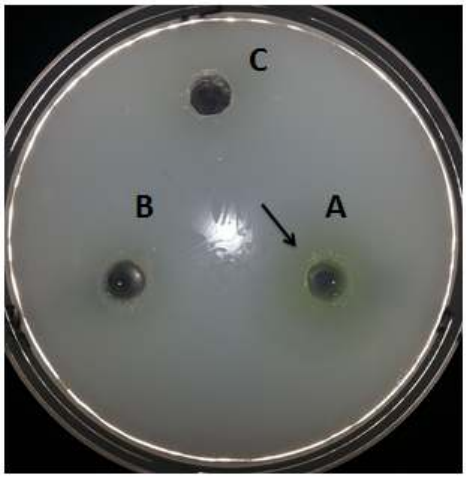


شكل(2) الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز بتركيز 1%. يمثل المسار 1:عزلة S. aureus المرضية، المسار 2 و 3: عزلة E. coli BL21 المتحولة

- **التحول الوراثي:** تم إجراء تجربة التحول الوراثي بواسطة الدنا البلازميدي المعزول من خلايا تحمل صفة المقاومة للمضادات الحياتية وبقابليتها على إنتاج الهيمولايسين ونقل هذه البلازميدات الى الخلايا المؤهلة للسلالة *E. coli*BL21(DE3) الحساسة لجميع المضادات الحياتية المستخدمة في هذه الدراسة باستثناء الرفامبين، ولا تملك صفة إنتاج الهيمولايسن. أظهرت نتائج زرع خلايا *E.coli* المتحولة على وسط أكار الدم إلى قابلية تلك الخلايا على تحليل الدم (شكل3– D و3 – F) مما يدل على ان هذه الخلايا كانت مستقبلة للدنا البلازميدي المعزول من *S. aureus* وان هذه الصفة هي صفة محمولة على البلازميدات، وهذا ما أشارت إليه العديد من الدراسات التي تناولت دراسة تلك الصفة، إذ ينتمي الهيمولايسين إلى مجموعة البروتينات المحللة لكريات الدم الحمر ويرتبط إنتاج الهيمولايسين على الأغلب بالعزلات المرضية سيما وانه يمثل عاملا من عوامل ضراوة البكتيريا (15). يؤدي الهيمولايسين دورا مهما في تزويد البكتيريا بما تحتاجه من الحديد كذلك يعمل الهيمولايسين على تحليل كريات الدم البيض وبذلك فهو يسهم في اضعاف وسائل الدفاع لدى المضيف وتعد عملية إنتاج إنزيم محلل الدم صفة ملاصقة لبكتريا *S. aureus* مما يزيد من ضراوتها ويمنحها القدرة على الغزو والانتشار (16).

شكل (3) اختبار تحلل الدم على وسط اكار الدم الصلب. A: عزلة *S. aureus* المرضية, B – H: سلالةE. coli BL21, وDF هي خلايا E. coli متحولة

كما أشارت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحياتية للخلايا المتحولة انتقال صفة المقاومة للمضادات الحياتية وتحول الخلايا المتحولة من حساسة إلى مقاومة للمضادات المستخدمة في الدراسة (جدول 2) كما موضح في الشكل (1– B) و(1 –C). إذا بينت النتائج انتقال صفة مقاومة المضادات الامبيسلسن، الميثيسلين، التوبرامايسن والباستراسين لخلايا *E. coli* المتحولة. لقد أثبتت العديد من الدراسات ان صفة مقاومة بكتريا *S. aureus* لمعظم المضادات الحياتية تشفر لها جينات محمولة على البلازميد أو الجينات القافزة Transposons (17، 18، 19)، إضافة إلى قدرة بعض أنواع البلازميدات على الانتقال من سلالة إلى أخرى بشكل طبيعي عن طريق عملية الاقتران البكتيري Conjugation حاملا معه صفة مقاومة المضادات الحياتية وهذا ما قد يفسر شيوع صفة مقاومة المضادات الحياتية بين أجناس البكتريا (20، 21). اظهر اختبار تحلل الكازائين قدرة بكتريا *S.aureus* على تحليل الكازائين من خلال ظهور الهالة الشفافة حول الحفرة (شكل 4–A) وذلك لقدرته البكتريا على إنتاج بروتينات تعمل على تحليل الكازائين المشابه في تركيبه للفايبرين– بوجود بلازما الدم، من هذه البروتينات هي بروتين Stapyhlokinase الذي تفرزه *S. aureus* ويستخدم كمذيب للتخثرات الدموية (22)، وان عدم ظهور الهالة الشفافة للخلايا المتحولة قد يعطي مؤشرا على ان الجين المشفر لهذا البروتين محمول على كروموسوم الخلية البكتيرية وليس على البلازميدات.



شكل (4) نتيجة اختبار الكازائينCaseinolytic assay، الحفرة A: S. aureus، الحفرة B: E.coliBL21(DE3)، الحفرة C: Ecoli BL21(DE3) المتحولة

المصادر

1. Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmiom, B. P. & Simmon, A. 1996. Mackie and McCarteny, Practical Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone inc., USA.
2. Omoe, K.; Ishikawa, M.; Shimoda, Y.; Hu, D. L.; Ueda, S. & Shinagawa, K. 2002. Detection of *seg*, *seh*, or *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. J. Clin. Microbiol., 40: 857-862.
3. McKinney, T. K.; Sharma, V. K.; Craig, W. A. & Archer, G. L. 2001. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is co-repressed but not co induced by cognate *mecA* and ß-lactamase regulators. J. Bacteriol., 183: 6862-6868.
4. O'Riodan, K. & Lee, J. C. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 17 (1): 218-234.
5. Ryan, K. J. & Ray, C. G. 2004. Sherris Medical Microbiology. 4th ed. McGraw-Hill-New York.
6. Gerdes, K.; Rasmussen, P. B. & Molin, S. 1986. Uniguetype of maintenance function postegregational killing of plasmid free cells. Proe. Natl. Acad. Sci. USA., 38: 3116-3120.
7. Snyder, L. & Champense, W. 1997. Molecular Genetics of Bacteria, American Society for Microbiology. Washing Tor. New York.
8. Martina, F.; Francois, J. P. & Menard, P. H. 2002. Development of a rapid PCR assay specific for *Staphylococcus* and application to direct detection from urine sample. J. Clin. Microbiol., 9(38): 3280-3284.
9. Cappuccino, J. G. & Natalie, S. 1987. Microbiology: A laboratory Manual. The Benjamin Cummings publishing Company. PP. 91-92.
10. Harris, R. J.; Gowans, E. & Lanser, J. 1996. Nucleic acid techniques in diagnostic microbiology. In: Practical Medical Microbiology. (Eds. By Collee, T. G.; Mornion, B. P.; Fraser, A. G. & Simmon, A.). 14th Ed., Churchill Livingston Ltd. PP. 978.
11. Samebrook, J.; Fritgah, E. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning, a labratory manual, cold spring Harbory. New York.

12. Remmert, L. F. & Cohen, P. P. 1949. Partial purification and properties of a proteolytic enzyme of human serum. J. Biol. Chem., 181: 431-448.
13. Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C. & Truck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Path., 36: 493-496.
14. Thieman, W. J. & Palladino, M. A. 2009. Introduction to Biotechnology. 2nd ed. Pearson education Inc. USA.
15. Nassif, X.; Mazert, M. J. & Sansoetti, P. 1987. Evaluation with an iuc : Tn 10 mutant of the role of aerobacterin Production in the virulence of Shigellaflexneri. Infect. Immun., 55: 1935-1969.
16. MacFaddin, J. F. 2000. Biochemical test for identification of medical bacteria. 3rd ed., The Williams & Wilkins Co., London.
17. Koneman, E. W.; Allen, S. D. & Janda, W. M. 1992. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 4ed. J. B. Lippincott. Philadelphia, USA.
18. Holden, M. T. G.; Feil, E. J. & Lindsay, J. A. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 101: 9786-9791.
19. Cooke, F. J.; Gkrania-Klotsas, E.; Howard, J. C.; Stone, M.; Kearns, A. M.; Ganner, M.; Carmichael, A. J. & Brown, N. M. 2010. Clinical, molecular and epidemiological description of a cluster of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*isolates from injecting drug users with bacteraemia. Clin. Microbiol. & Infections, 16: 921-926.
20. Spratt, J. L. 1989. Antimicrobial drug in essentials of pharmacology. F. A. Davis company, Philadelphia. 363-407.
21. Ganjian, H.; Nikokar, I.; Tieshayar, A.; Mostafaei, A.; Amirmozafari, N. & Kiani, S. 2012. Effects of Salt Stress on the Antimicrobial Drug Resistance and Protein Profile of Staphylococcus aureus. Jundishapur J. Microbiol., 5 (1): 328-331.
22. Collen, D. & Lijnen, H. R. 1994. Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potential. Blood, 84: 680-686.