ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴
صفحه ۱۲۸-۱۲۳

بیان ژن *ompF* در موتان‌های *E. coli* مقاوم به سیپروفلوکساسین 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 کارشناسی‌ارشد، استادیار و دانشیار، دانشگاه شهرکرد، ایران

Heidari F[1], Pourahmad R*[1], Shareghi B[1]

1. 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 فلوروکینولون‌هایی مانند سیپروفلوکساسین به داخل سلول باکتریایی 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 مضاعف *gyrA marR* بود. بیان ژن *ompF* در موتان‌های فوق با MICهای کم و متوسط برای سیپروفلوکساسین و تتراسیکلین در مقایسه با تیپ وحشی MG1655 با روش PCR 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 سیپروفلوکساسین و تتراسیکلین در موتان‌های بررسی شده باعث کاهش بیان ژن *ompF* نشد.

واژه‌های کلیدی

مقاومت چند دارویی
موتان *gyrA marR*
E. coli
ompF
QPCR

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.13.9]

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 جیراز)، کاهش بیان یا تغییر در کانال 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*) بروز دهند (Ruiz 2003).

سیپروفلوکساسین[1] یکی از انواع فلوروکینولون‌ها، است که فعالیت گسترده‌ای در مقابل باکتری‌های گرم منفی نظیر *E. coli* دارد (Ruiz 2003). یکی از اهداف سیپروفلوکساسین در سلول باکتری آنزیم DNA جیراز (توپوایزومراز II) است. اتصال این آنتی بیوتیک به آنزیم DNA جیراز متصل به DNA باعث مهار فعالیت آنزیم می‌شود. موتاسیون در زیرواحدهای جیراز ظاهرا میل ترکیبی آن به فلوروکینولون‌ها را کاهش و یا از بین می‌برد (Barnard and Maxwell 2001). پورین OmpF کانال پروتئینی غیر اختصاصی می‌باشد که ورود مواد غذایی و آنتی بیوتیک‌هایی مانند فلوروکینولون‌ها را به درون سلول تسهیل می‌کند. *micF* ژن کد کننده یک RNA آنتی سنس 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 *marRAB* در مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند، کلرامفنیکل[2]، فلوروکینولون‌ها و تتراسیکلین[3] نقش دارد. این اپرون، یک مهارکننده به نام MarR 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 فعال‌کننده در *marR* و دومین مسیر در معرض قرارگیری باکتری با ترکیبات متنوع نظیر کلرامفنیکل 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 بیان *ompF* در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در *E. coli* قبلا گزارش شده است (Kishii and Takei 2009).

هدف این تحقیق بررسی میزان بیان ژن *ompF* در نمونه‌های موتان *gyrA* و موتان مضاعف *gyrA marR* مقاوم به سیپروفلوکساسین و تتراسیکلین در مقایسه با نمونه‌های تیپ وحشی، با روش PCR در زمان واقعی[4] بود.

در این تحقیق از موتان‌های *gyrA* با مقاومت پایین به سیپروفلوکساسین شامل سه موتان W25، W26 و W49 استفاده شد (Pourahmad and Mohiti 2010; Pourahmad et al. 2012). همچنین کلون‌های حاصل از آنها RE6 و RE16 (Pourahmad and Ebadi 2013) نیز مورد استفاده قرار گرفتند (جدول۱). براساس تقسیم‌بندی از پیش تعریف شده، این کلون‌ها جزو انواع با مقاومت متوسط به سیپروفلوکساسین 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 محافظ RNA[5] کیت RNeasy Protect Bacteria Kit برای 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 فرمنتاز (DNase I, RNase- free) روی نمونه RNA استخراج شده انجام شد. برای این منظور از یک میکرولیتر آنزیم و بافر 10X بازای 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.

[1] Ciprofloxacin
[2] Chloramphenicol
[3] Tetracycline
[4] Real-time PCR
[5] RNA protect bacteria reagent

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.13.9]

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

ژنتیکی خصوصیات	MIC کلرامفنیکل (µg/ml)	MIC تتراسیکلین (µg/ml)	MIC سیپروفلوکساسین (ng/ml)	سویه/ موتان/ کلون
تیپ وحشی	۴	۳	۳۵	MG1655
موتان جدا شده از تیپ وحشی دارای موتاسیون در GyrA (Ser$_{83}$→ Leu)، MarR (Met$_{74}$→ Thr)	۵	۴	۷۵	W25
موتان جدا شده از تیپ وحشی دارای موتاسیون در GyrA (Ser$_{83}$→ Leu)	۵	۴	۷۵	W26
موتان جدا شده از تیپ وحشی دارای موتاسیون در GyrA (Ser$_{83}$→ Leu) و تکرار ۲۰جفت بازی در اپراتور *marO*	۵	۵	۶۲۵	W49
کلون حاصل از W25 با همان موتاسیونها	۴۵	۴۵	۱۰۰۰	RE6
کلون حاصل از W49 با همان موتاسیونها	۴۰	۳۰	۱۰۰۰	RE16

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

نوع آغازگر	ترتیب توالی (3' – 5')	ژن	اندازه محصول (جفت باز)
رفت (F)	ACTTACGAGCAGATCAAAGC	*gapA*	۱۷۰
برگشت (R)	AGTTTCACGAAGTTGTCGTT		
رفت (F)	CGTACTTCAGACCAGTAGCC	*ompF*	۲۰۹
برگشت (R)	GAACTTCGCTGTTCAGTACC		

برای سنتز cDNA از کیت فرمنتاز RevertAid^{TM} Reverse (Transcriptase) استفاده شد و تمام مراحل کار طبق دستورالعمل کیت انجام گرفت. از دو میکروگرم RNA برای سنتز cDNA 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 قبلا توصیف شده است (Viveiros et al. 2007).

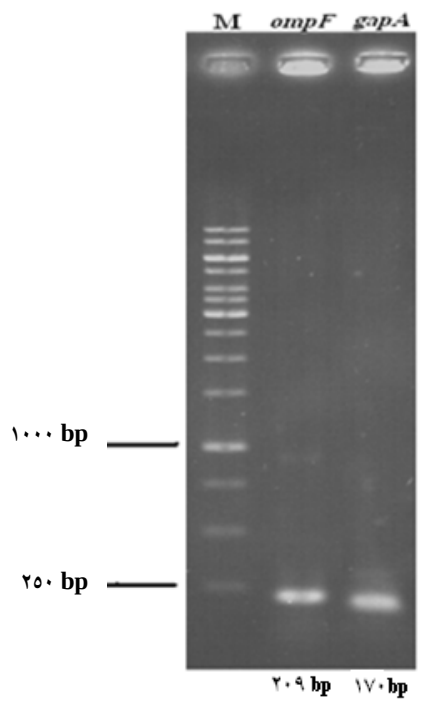
داده‌های حاصل به روش سنجش بیان نسبی ارزیابی شدند (Pfaffl et al. 2002). همچنین برای هر موتان دو نمونه جهت واکنش PCR تهیه شد (دو تکرار). برای این منظور همه داده‌ها با ژن ضروری *gapA* به عنوان کنترل داخلی نرمال شدند. بیان کمی نسبی از نسبت زیر بدست می‌آید:

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

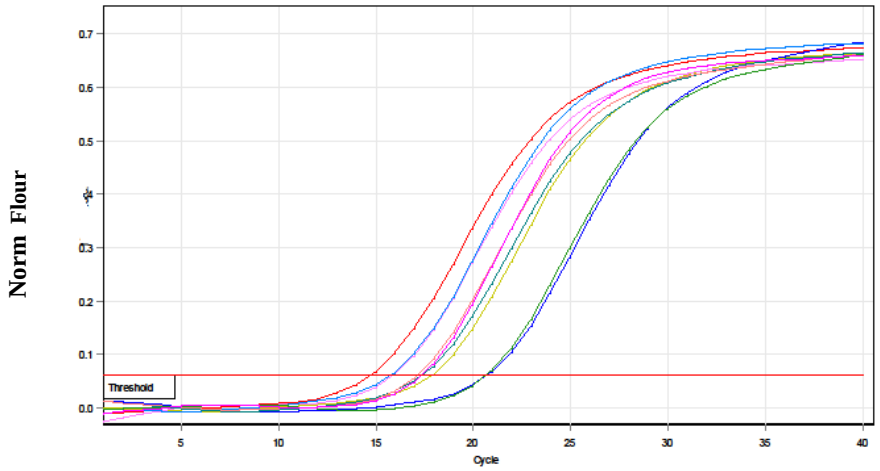
$$\Delta Ct = Ct_{\text{موتان}} - Ct_{\text{سویه تیپ وحشی}}$$

(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 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 سویه-های موتان و سویه کنترل (تیپ وحشی) ارزیابی شد (P<۰/۰۵). بعد از سنتز کتابخانه cDNA با کمک آغازگرهای تصادفی از RNAهای 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. شکل۱ 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 (شکل۲). منحنی ذوب این دو ژن تنها یک قله را نشان داد که تکثیراختصاصی ژن‌های مورد نظر و عدم آلودگی به DNA ژنومی در واکنش می‌باشد. نقطه ذوب *ompF* و *gapA* به ترتیب ۸۷ و ۸۶ درجه سانتی‌گراد بود (شکل۳).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.13.9]



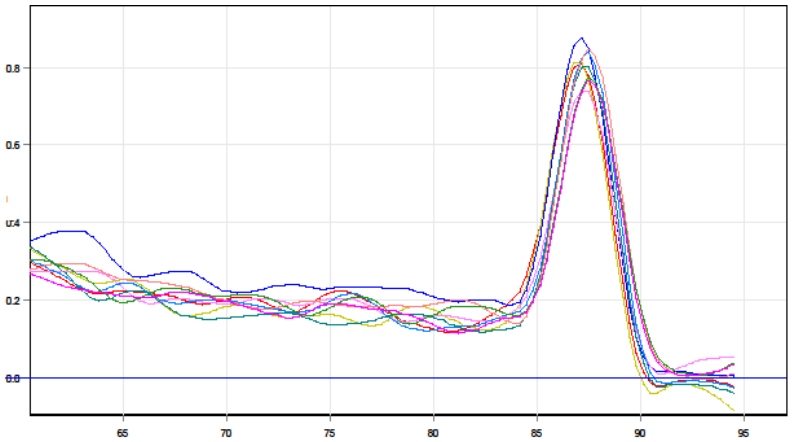
شکل۱- ژل الکتروفورز محصول PCR. چاهک اول از چپ مربوط به نشانگر DNA و دو چاهک بعدی به ترتیب مربوط به ژن *ompF* و *gapA* می باشد. اندازه هر محصول زیر نویس شده است.



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.

شیب 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 Ctهای بدست آمده جهت محاسبه بیان استفاده شد. بیان نسبی *ompF* در موتان‌ها و نمونه کنترل با روش Pfaffl et al. (2002) محاسبه شد (جدول۳). مقایسه نتایج بیان ژن *ompF* در هر یک از نمونه‌های موتان نسبت به سویه تیپ وحشی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P<۰/۰۵$). این مسئله می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که مقاومت سطح پایین و متوسط این موتان‌ها به سیپروفلوکساسین 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 سیپروفلوکساسین و تتراسیکلین، اختلاف معنی‌داری در بیان *ompF* در سویه‌های موتان نسبت

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.13.9]



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

جدول ۳- بیان نسبی ژن *ompF*

سویه/ موتان/ کلون	بیان نسبی ژن *ompF*
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 طوری‌که 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 تشکر و سپاسگزاری را از دانشگاه شهرکرد و پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه شهرکرد جهت حمایت مالی این تحقیق داریم.

منابع

Alekshun MN, Levy SB (1997) Regulation of chromosomally meditated 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 Ser^{83} and Asp^{87}. 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 resitance 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.13.9]

Pourahmad Jaktaji R, Mohiti E (2010) Study of mutations in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Iranian Journal of Pharmacutical 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 Pharmacutical 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.1.13.9]