الصفات المميزة للـ DNA البلازميدي المنقى من جرثومة *Escherichia coli* المعزولة من حالات مرضية مختلفة

خالد دحام احمد
قسم علوم الحياة
كلية التربية
جامعة الموصل

بيداء غانم محمد
فرع الاحياء المجهرية
كليةالطب البيطري
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2002/6/12 ، تاريخ القبول 2002/10/1)

الملخص

تم عزل نماذج من جرثومة *E.coli* من حالات مرضية مختلفة تمثلت بالتهاب المجـاري البوليـة، اسهال اطفال والتهاب الاذن الوسطى بعد تشخيصها باستخدام الصفات الزراعية والاختبارات الكيماحياتية، صنفت هذه العزلات اعتمادا على مقاومتها للمضادات الحيوية (الامبسيلين، الكلورامفينكول، التيتراسايكلين والستروميسين سلفيت) الى خمس مجاميع من عزلات *E.coli* اظهرت اختلافا في مقاومتها للمـضادات الحيوية المستخدمة، ولغرض وصف الـ DNA البلاميدي من عزلات *E.coli* اظهـرت اختلافـا **فـي** مقاومتها للمضادات الحيوية المستخدمة، ولغرض وصف الـ DNA البلازميدي من عزلات *E.coli* فقـد تم اختبار مجموعة من الصفات والتي ظهرت ان معظم الـ DNA البلازميدي في العزلات المختبرة لـه القابلية على الانتقال الذاتي من خلال عملية الاقتران الجرثومي كما اظهر **الـ** DNA البلازميدي قابليـة على تضخيم عدد نسخه بعد المعاملة الطويلة للمزارع الجرثومية بالكلورامفينيكول باسـتثناء الـ DNA البلازميدي المنقى من العزلة المسببة لالتهاب الاذن الوسطى.

Characteristic Features of Plasmid Purified from *Escherichia coli* Isolated from Various Human Infection

Khlid Daham Ahmed
Department of Biology
College of Education
Mosul University

Khlid Daham Ahmed
Department of Microbiology
College of Veterinary
Mosul University

ABSTRACT

Specimence of *E. coli* cultures isolated from different humane sources of infections (Urinary tract, diarrhea and otitis media) after identification, using cultural characters,

biochemical tests and serotyping. These cultures classified according to their resistance to the antibiotics (Ampicilline, chloramphenicol, tetracycline and streptomycine sulfate) to five groups of *E. coli* isolates show variations in their resistance to these antibiotics in order to characterize the purified plasmid DNA of isolated *E. coli*, a group of properties were examined and they show that most plasmid DNA in these isolates are capable to transfer itself among *E. coli* isolates through conjugation process. In addition plasmid DNA shows ability to amplify its copy number after prolonged treatment of cultures with chloramphenicol except for one that purified from strain isolated from otitis media.

المقدمة

ظهر مصطلح البلازميد لاول مرة من قبل Lederberg في سنة (1952) وهي جزيئات DNA حلقية صغيرة تتواجد بشكل مستقل عن كروموسوم المضيف في سايتوبلازم معظم انواع الجراثيم وبعض الكائنات حقيقية النواة (الخمائر والفطريات). تكون البلازميدات غير ضرورية لحياة المضيف الا ان وجودها يعطي المضيف صفات اضافية تمكنه من العيش تحت ظروف استثنائية من هذه الصفات هي المقاومة للمضادات الحيوية، انتاج الهيمولايسين وغيرها من الصفات المهمة (Prescot et al., 1966 ; Broda, 1979) ، تملك البلازميدات العديد من الجينات التي تشفر للسيطرة على وقت تضاعف البلازميد وعدد نسخه في الخلية. وهناك بعض البلازميدات التي تمتلك مجموعة من الجينات التي تعرف بجينات الانتقال Transfer genes (tragenes) التي تحفز انتقال البلازميدات وحدوث عملية الاقتران بين الخلايا الجرثومية. ويعتبر الاقتران الجرثومي نظاما خاصا تنتقل بواسطته المعلومات الجينية من خلية لاخرى (Pozleitner et al., 1997) وغالبا تمتلك البلازميدات الكبيرة القابلية على الانتقال من الخلية الواهبة الى الخلية المستلمة خلال الاقتران والمثال التقليدي لهذا النوع من البلازميدات هو العامل F وبعض انواع البلازميد R.

هناك ثلاثة متطلبات مهمة للنقل الاقتراني بالبلازميدات وهي مجموعة من الجينات وقد اشار Strohmier et al. (1998) الى ان اكثر من 30 جينا يتطلب لتحفيز الاقتران بالبلازميدات فضلا عن ذلك تتطلب العملية موقع متخصص على البلازميد يبقى لحظة الانتقال يعرف بموقع النقل وبروتين لتحفيز الانتقال بواسطة ارتباطه بالموقع (Orit) يعرف بـ Mobilization protein (mob) (Willetts et al.,1975). البلازميدات التي تمتلك (tragenes) و (mob protien) و (Orit) تسطيع تحفيز انتقالها وتعرف بالبلازميدات الاقترانية (Clark and Warren, 1974 ; Wessell and Hopson, 1988).

العديد من البلازميدات الصغيرة الفائدة ال (tragenes) لاتستطيع ان تصبح مقترنة لانها لاتستطيع تكوين جسور بروتوبلازمية مع الخلايا المستلمة لكن مع ذلك تستطيع الانتقال اذا غالبا تمتلك بروتين (mob) الذي يميز موقع فعال يعرف بـ (Basis of mobilization, bom) ويكون مماثلا وظيفيا لـ (Orit) الموجود على البلازميدات الكبيرة المقترنة فقط وهذه تمكن البلازميدات الصغيرة من الانتقال من

الخلية الواهبة الى الخلية المستلمة خلال جسر الاقتران الذي يجهز بواسطة البلازميدات الاقترانية والتـي تكون موجودة في نفس الخلية بصورة منفصلة .هذه العملية لاتتطلب اتصالا فيزيائيا بين البلازميدات وان ميكانيكية الانتقال في البلازميدات المتحركة مشابهة للبلازميـدات الاقترانيـة (Warren et al., 1978 ; Brasch and Meyer, 1986).

فضلا عن ذلك تمتلك بعض البلازميدات القابلية على التضاعف عند تثبيط بناء البروتينـات حيـث اشارت العديد من البحوث الى انه عند تثبيط بناء البروتينات من الخلية الحية بواسطة تجويع الاحمـاض الامينية او تنمية الخلايا الحاوية على البلازميد بوجود المضاد الحيوي الكلورامفينيكول حيث يتوقف بنـاء كروموسوم الخلية بينما تستمر البلازميدات باالتضاعف (Clewell, 1972 ; Azad et al., 1992) ومـن هذه البلازميدات ، البلازميد المقاوم للمضادات الحيوية.R-Plasmid وبلازميد ColEi من *E.coli* حيـث تصل عدد نسخ هذه البلازميدات الى اكثر من 3000 نسخة بعد التحضين (Broda, 1979).

ان لخاصية تضخيم عدد نسخ البلازميدات ضمن الخلية البكتيرية اهمية كبيرة اذ انها لاتسمح فقـط بالعزل للبلازميدات بمعدلات كبيرة وانما تسمح ايضا ببناء كميات كبيرة من المواد التـي تـشفرها هـذه البلازميدات مثل قطع الـ DNA المكونة في البلازميد في تقنية الهندسة الوراثية (Priefer, 1984).

المواد وطرائق العمل

جمع النماذج:

تم الحصول على25 عينة من جرثومة *E.coli* معزولة **من** حالات مرضيةمختلفة (اسهال اطفـال، التهاب الاذن الوسطى، التهاب المجاري البولية) من مستشفى ابن الاثير للاطفال في الموصـل. جمعـت العينات باستخدام موائل الاكار المغذي.

الاوساط الغذائية:

جميع الاوساط الغذائية المستخدمة في هذه الدراسة كانت من شركة Merck وOxoid .

التشخيص المختبري:

بعد جمع العينات وايصالها الى المختبر درست الصفات الشكلية والزرعية للعينات حيث تم دراسـة حجم وشكل المستعمرات الجرثومية وتخميرها سكر اللاكتوز. بعدها تم تنميط هذه العينات مـصليا فـي مستشفى صدام العام.

الاختبارات الكيمياحياتية:

تم تحديد الصفات الكيمياحياتية لجرثومـة *E.coli* بـاجراء اختبـارات IMVic حـسب طريقـة (Finegold and Martine, 1982 ; Koneman et al., 1997).

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية:

استخدمت طريقة Mainatis et al. (1982) حيث تم تحضير محاليل جزيئية من المضادات الحيوية بالـ (µg/ ml) من الامبسلين (50)، التيتراسايكلين (15)، الكلورامفينكول (10) والستروميسين سلفيت (25) عقمت هذه المحاليل بالترشيح وحضنت تحت درجة حرارة -20°م.

ولاجراء فحص الحساسية لعزلات *E.coli* حيث حضر وسط الاكار المغذي ووزع في دوارق وعقم بجهاز الموصدة وترك ليبرد الى درجة 48°م ثم اضيفت المضادات الحيوية بالتراكيز النهائية وهي بالـ (µg/ ml) (مايكروغرام /مل) فكانت للامبسلين (50)، التيتراسايكلين (15)، الكلورامفينكول (10) والستروميسين سلفيت (25). صبت اوساط المضادات الحيوية في اطباق معقمة وتركت لتتصلب بدرجة 25°م. لقحت العزلات الجرثومية على اوساط المضادات الحيوية بطريقة التخطيط ، حضنت الاطباق عند درجة 37°م لمدة 24 ساعة ثم قرات النتائج في اليوم الثاني.

الاقتران الجرثومي Conjugation:

تم اجراء الاقتران الجرثومي بين عزلات جرثومة *E.coli* المعزولة من حالات مرضية مختلفة حسب طريقة Data and Nugent (1984) . تم ايجاد تردد الاقتران حسب Slle (1973).

عزل الحامض النووي ال DNA البلازميدي:

قياس (50) **مل** من المزرعة الجرثومية حسب طريقة Birnboin and Doly (1979) .

تقدير تركيز ال DNA البلازميدي المحضر طيفيا:

استخدمت الطريقة المتبعة من قبل Ahmad (1989) لغرض قياس تركيز الـ DNA البلازميدي المحضر.

اختبار قابلية الـ DNA البلازميدي المنقى على تضخيم عدد نسخه:

اتبعت طريقة Clewel (1972) لاختبار قابلية الـ DNA البلازميدي المنقى على تضخيم عدد نسخه.

النتائج

تشخيص العزلات:

تم جمع (25) نموذجا من جرثومة *E.coli* المعزولة من حالات مرضية مختلفة من الانسان اذ تضمنت (10) نماذج من حالات اسهال الاطفال، (10) من التهاب المجاري البولية و (5) من حالات التهاب الاذن الوسطى. اجري التشخيص الاولي للعزلات بتلقيحها على وسط اكار ماكونكي لملاحظة شكل ولون مستعمرات جرثومة *E.coli* والتي تكون دائرية ملساء مخمرة لسكر اللاكتوز وذات لون وردي على وسط ماكونكي وللتاكد من تشخيص هذه المستعمرات فقد تم تلقيحها لون اسود وبريق معدني اخضر . اجريت صبغة كرام لتشخيص عصيات الـ *E.coli* القصيرة غير المكونة للسبورات والسالبة لصبغة كرام

تم ايضا اجراء عدد من الاختبارات الكيمياحياتية لعزلات *E.coli* على وسط (EMB) الانتقائي اذ ظهرت مستعمرات *E.coli* على هذا الوسط دائرية، ملساء، ذات والتي اعطت نتيجة موجبـة لاختبـار الانـدول واختبار المثيل الاحمر (M.R.) وسالبة لاختبار الفوكس بروسكور (V.P.) والسترات ثم تم تحديد النـوع المصلي للعزلات وتبين انها تابعة للنوع المصلي (EPEC) Enteropathogenec *E.coli* .

مقاومة المضادات الحيوية:

اختبرت حساسية جرثومة *E.coli* المعزولة من حالات مرضية مختلفة لاربع مضادات حيوية وهي الامبسلين، التيتراسايكلين، الكلورامفينكول والستروميسين سـلفيت باسـتخدام طريقـة Mainatis et al. (1982) الموصوفة سابقا وقد اضهرت هذه العزلات المدروسة تباينا واضحا في مقاومتهـا للمـضادات الحيوية المستخدمة واعتمادا على هذا الاساس فقد اختيرت (5) عزلات من هذه الجرثومة للاعتماد عليهـا في التجارب الوراثية وكما هو في الجدول (1).

الجدول 1: مصادر سلالات جرثومة *E.coli* ومقاومتها للمضادات الحيوية.

رقم الفقرة	مصدر العزل	اوساط الاكار المغذي الحاوي على التراكيز النهائية للمضادات الحيوية ((µg/ ml))			
		الامبسلين (50)	الكلورامفينكول (10)	تتراسايكلين (15)	ستروبتومايسين سلفيت (25)
1	التهاب المجاري البولية	R	R	R	R
2	التهاب المجاري البولية	R	R	S	S
3	ا سهال الاطفال	S	R	R	S
4	ا سهال الاطفال	R	S	R	R
5	التهاب الاذن الوسطى	R	S	S	S

R : صفة المقاومة للمضاد الحيوي.

S : صفة الحساسية للمضاد الحيوي.

الاقتران الجرثومي Conjugation:

لتحديد مواقع المورثات المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحيوية وكذلك للتعـرف علـى قابليـة البلازميدات الموجودة في هذه العزلات الجرثومية على الانتقـال الـذاتي، اجريـت تجـارب الاقتـران الجرثومي بين عزلات جرثومة *E.coli* المعزولة من حالات مرضية مختلفة والتي هي من جنس واحـد ولقد اختيرت العزلات (3,4)، (2,4)، (3,5) وكما مبين في الجدول (2).

الجدول 2: السلالات الواهبة والمستلمة وتردد الاقتران الجرثومي.

ت	العزلات الواهبة	العزلات المستلمة	العزلات المقترنة	تردد الاقتران
1	Cm^S, Ap^R	Cm^R, Ap^S	Cm^R, Ap^R	1.1×10^{-6}
2	Tet^R, Cm^S, St^R	Tet^S, Cm^R, St^S	Tet^R, Cm^R, St^R	1.3×10^{-6}
3	Tet^R, Ap^S	Tet^S, Ap^R	Tet^R, Ap^R	0.5×10^{-6}

التضخيم الجيني Gene Amplification :

من الصفات المهمة التي تمت دراستها للـ DNA البلازميدي في عزلات *E.coli* هي قابليته علـى زيادة عدد نسخه في الخلية الجرثومية ويتم ذلك باضافة الكلورامفينكول بتركيـز (150 µg/ ml) الـى الطور اللوغارتمي للمزارع الجرثومية حسب طريقة Clewel (1972) وكما هو مبين في الجدول (3).

الجدول 3: تاثير اضافة الكلورامفينكول (150 µg/ ml) الى الطـور اللوغـارتمي للمزارع الجرثومية النامية لعزلات *E.coli*.

رقم العزلة	متوسط تركيز الـDNA البلازميدي قبل اضافة الكلورامفينكول	متوسط تركيز الـDNA البلازميدي بعد اضافة الكلورامفينكول
1	1.22 C	2.10 A
2	0.89 D	1.58 B
3	0.83 DE	1.16 C
4	0.84 DE	1.25 C
5	0.68 E	0.68 E

المناقشة

الاقتران الجرثومي Bacterial Conjugation:

من الصفات المميزة للـ DNA البلازميدي في عزلات جرثومة *E.coli* المدروسة هي قابلية هـذه البلازميدات على الانتقال الذاتي بين العزلات المختلفة مستخدما عليمتين وراثيتين على الاقـل (المقاومـة للمضادات الحيوية) والجدول (2) يوضح اختيار العزلات التي تختلف بتلك العلائم الوراثيـة وقـد نمـت المستعمرات المقترنة على الاوساط الغذائية الحاوية على المضادات الحيويـة والتـي هـي الامبـسلين والكلورامفينكول لعملية الاقتران الاولى و التيتراسايكلين والستروميسين والكلورامفينكول لعملية الاقتران الثانية، اما لعملية الاقتران الثالثة فقد اضيفة الى الوسـط الغـذائي التيتراسـايكلين والامبـسيلين. نقيـت المستعمرات المقترنة اكثر من مرة لثبات اكتسابها الصفات الوراثيـة الجديـدة. امـا نمـاذج الـسيطرة المستخدمة في هذه التجربة فلم نلاحظ فيها نمو أي مستعمرة مقترنة على الاوساط الغذائية الحاوية علـى المضادات الحيوية المستخدمة كصفات انتخابية.

ان انتقال البلازميدات من الخلية الواهبة الى الخلية المستلمة يشير على ان المورثات الواهبة المقاومة للمضادات الحيوية واقعة على نفس جزيئة الـ DNA البلازميدي وكما موضح في الجدول (2) وكذلك يتبين ايضا قابلية الـ DNA البلازميدي على الانتقال الذاتي والحركة الى العزلات الاخرى من جرثومة *E.coli* هذه النتائج تتفق مع ما حصل عليه Warren et al. (1978) ; Brasch and Meyer (1986) وقد بين هؤلاء ان سبب حصول عملية الاقتران يعود الى العديد من الاحتمالات منها ان هذه البلازميدات تمتلك المستلزمات الضرورية لعملية الاقتران او انها تنتقل بواسطة بلازميد اخر موجود في نفس الخلية والاحتمال الاخر انها تشكل معقد مع بلازميدات اخرى وتنتقل بمساعدته.

ان ثبوت الصفات الجديدة في المستعمرات الناتجة من عملية الاقتران بعد عملية التنقية يشير الى ان هذه البلازميدات هي بلازميدات متوافقة plasmid Compatibility تستطيع ان تتواجد سوية في نفس الخلية وهذا يتفق مع ما توصل اليه Schofft and Puhler (1979) اذ بينا ان سبب ظهور الصفات الجديدة في المستعمرات المقترنة وعدم فقدانها بعد عملية التنقية يعود الى صفة التوافق بين هذه البلازميدات.

التضخيم الجيني Gene Amplification :

ان اضافة المضاد الحيوي الكلورامفينكول بتركيز (150 µg/ ml) الى الطور اللوغارتمي للمزارع الجرثومية يؤدي الى زيادة عدد نسخ الـ DNA البلازميدي في هذه المزارع الجرثومية. اذ نلاحظ من هذا الجدول (3) وجود اختلاف معنوي في تركيز الـ DNA البلازميدي المحضر من عزلات جرثومة *E.coli* قبل وبعد اضافة الكلورامفينكول وتكون هذه الزيادة في التركيز كبيرة اذا ما قورنت مع التراكيز للـ DNA البلازميدي المحضر من نفس المزرعة الجرثومية غير المعاملة بالكلورامفينكول وكذلك يتبين ايضا وجود اختلاف في قابلية التضخيم بين العزلات رغم انها من نفس النوع، اذ يلاحظ ان العزلة (5) لم يظهر فيها زيادة في تركيز الـ DNA البلازميدي بعد باضافة الكلورامفينكول (150 µg/ ml) حيث لا يمتلك الـ DNA البلازميدي لهذه العزلة خاصية تضخيم عدد نسخه، وان هذه الزيادة في التركيز تحدث بعد تثبيط بناء البروتين باضافة الكلورامفينكول وتكون ناتجة عن زيادة معدل تضاعف الـ DNA البلازميدي في مستوى مرتفع مقارنة مع ماهو عليه في الظروف الطبيعية، بينما يبقى تركيز الـ DNA الكروموسومي ثابت بسبب تثبيط بناء البروتين، وان هذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه ; Azad (1972) Clewell (1992) وقد عزى هؤلاء سبب الزيادة الخطية في تركيز الـ DNA البلازميدي ربما يعود الى ان كل جزيئة بلازميد جديدة في الخلية الجرثومية بعد اضافة الكلورامفينكول تستخدم كقالب من قبل انزيمات التضاعف والتي تكون موجودة بكميات كبيرة في الخلية نتيجة لتوقف تصنيع البروتين الكروموسومي.

المصادر الاجنبية

Ahmad, K.D., 1989. The postive control of I/v C expression in *E. coli* K. 12. Ph.D. Thesis, Univ. Durham, England.

Azad, A.K., Coote, J. and Prton, R., 1992. Distinct plasmid profiles of *Pasteurella Haemolytica* serotypes and the characterization and amplification in *E. coli* of Ampiciline resistance plasmids encoding bRoB-1 beta. Lactamase. J. Gen. Microbiol., Vol.138,1185 p..

Birnboim, H.C. and Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for Screening recombination plasmid DNA. Nucleic Acids Res., Vol.7, 1513 p..

Brasch, M.A., Meyer, R.J., 1986. Genetic orgnization of plasmid R1162 DNA Involved in conjugation mobilization. J. Bacteriol., Vol.167, pp.703.

Broda, P., 1979. Plasmid. W.H. Freeman and company, pp.1,3, 59-88.

Clark, A.J. and Warren, G.J., 1979. Conjugal Transmission of plasmid .Ann .Rev. Genet., Vol.13, 99 p..

Clewell, D.B., 1972. Molecular structure of bacterial replication in *E. coli* in the Presence of chloramphenicol. J. Bacteriol., Vol.110, 667 p..

Data, N. and Nugent, Z.M.E., 1984. Characterization of plasmid in wild strains of bacteria, in: Puhler, A. and Timmis, K.N. (eds.), Advanced in Molecular genetic. Springer–Verlag, New York, pp.39–50.

Finegold, S.M. and Martin, W.J., 1982. Diagnostic microbiology (6th ed.), C.V. Mosby Co., London, pp.210–214.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. and Jr, W.C., 1997. Color atlas and text book of diagnostic microbiology, (5 th ed.), Lippin Cott- Raven publishers, Philadelphia., pp.141-175.

Pozieitner , E., Zechner, E.L., Renner, W., Fratte, R., Jauk, B., Hogenauer, G. and Koraiman, G., 1997. Tra M of plasmid R1 controls trans fergene expression as an integrated control elementin a complex regulatory network. Mol. Microbiol., Vol.25(3), 495 p..

Priefer, U., 1984. Isolation of DNA, in: Puhler, A and Timmis, K.N. (eds.), Advanced in molecular genetic. Springer–Verlarg, New York, pp.14-24.

Salle, AJ., 1973. Fundemental principles of bacteriology (7 th ad.), McGraw Hill Book company, New York, pp.274–275.

Schofft, F and Puhler, A., 1979. The plasmid system of *E. coli* strain UR 2644.Genet. Res. Camb., Vol.34, 287 p..

Strohmair, H., Noiges, R., Kotschhan, S., Swers, G., Hogenaner, G., Zechner, E.L. and Koraiman, G., 1998. Sgnal transduction and bacterial conjugation: characterization of arch A in regulating conjugative transfer of the resistene plasmid R1. J. Mol. Biol., Vol.277, 309 p..

Warren, G., Twigy, A.J. and Sherratt, D.J., 1978. Col El plasmid mobility and Relaxation complex .Nature., Vol.274, 259 p..

Wessell, N.K. and Hopson, J., 1988. Biology Random Hous, Inc., New York, pp.303–320.

Willetts, N.S. Maule, J. and Mclntire, S., 1975. The genetic location of trao pand Tra–4 on the *E. coli* K12 sex factor F. Genet. Res., Vol.26, 255 p..