P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2012 ,(6), (3) :00-00

التحري عن جين *sk* المشفر لبروتين Streptokinase في بعض السلالات البكتيرية المرضية

حارث كامل بنية

جامعة الانبار -كلية التربية للعلوم الصرفة

معلومات البحث:
تاريخ التسليم: 2012/5/6
تاريخ القبول: 2012/9/16
تاريخ النشر: 29/ 8 / 2013
DOI: 10.37652/juaps.2012.77312

الكلمات المفتاحية:
جين sk،
Streptokinase ،
البكتيرية المرضية.

الخلاصة:

تهدف الدراسة الحالية الى التحري عن انتشار جين sk المشفر لبروتين الستربتوكاينيز Streptokinase في البكتريا المرضية, حيث تم جمع 22 عزلة بكتيرية من حالات مرضية مختلفة وتم إجراء اختبار الكازين Caesinolytic assay للكشف عن قابلية البكتريا على انتاج هذا البروتين, 12 عزلة من مجموع العزلات المستخدمة في الدراسة أعطت نتيجة موجبة في هذا الاختبار. استخُلص الدنا البلازميدي لهذه العزلات واستُخدم الدنا المستخلص كقالب لبناء الجين المشفر للبروتين باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل وباستخدام بوادئ متخصصة للجين المطلوب. تم الحصول على قطعة دنا بحجم 1.3 كيلو زوج قاعدي من عزلتين من بكتريا E. coli وتم تحديد حجم قطعة الدنا باستخدام الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز مقارنة بالدليل الحجمي القياسي للدنا.

المقدمة:

الستربتوكاينيز (SK) Streptokinase هو بروتين تفرزه مجاميع مختلفة من بكتريا Streptoccci المحللة للدم من نوع β, وزنه الجزيئي 47 كيلو دالتون ويشفر له جين الـ *sk* ذو الحجم 1.3 كيلو زوج قاعدي , يتالف البروتين من سلسلة ببتيدية مكونة من 414 حامض اميني تؤلف ثلاث مقاطعات Domains هي α , β و γ (1).

يعتبر الستربتوكاينيز من عوامل إذابة الجلطة Thrembolytic agents غير التخصصية للفايبرين non-fibrin specific إذ يكون للبروتين القدرة على الارتباط بمولد البلازمين مكون معقد الستربتوكاينيز – مولد البلازمين حيث يعمل هذا المعقد على تحويل مولد البلازمين Plasmingen إلى البلازمين plasmin والذي يقوم بتحليل الفايبرين , البروتين الرئيسي المكون للخثرة الدموية (2,3).

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Education for Pure Sciences;
ORCID: https://orcid.org/0000-0001-5859-6212 .Mobil:777777
E-mail address:

تم عزل بروتين الستربتوكاينيز لاول مرة عام 1933 من راشح لمزرعة *Streptococcus* واطلق عليه تسمية Streptococcal fibrinolysin (4), اما مصطلح Streptokinase فاستخدم لاول مرة عام 1945. وتم تحديد تتابع الأحماض الامينية له بصورة كاملة من قبل Jackson and Tang عام 1982 (5).

أستُخدم الستربتوكاينيز في علاج حالات احتشاء عضلة القلب Myocardial infarction منذ عام 1959, وفي علاج انسداد الشرايين Peripherial arterial occlusive منذ عام 1974, ويستخدم حاليا بشكل واسع في العديد من دول العالم (6).

يُعد الستربتوكاينيز كذلك من عوامل الضراوة بالنسبة للبكتريا إذ يعتبر كعامل انتشار (Spreading factor) يسهم في تسهيل انتشار البكتريا من خلال تنشيطه لإنزيم Metalloproteases أو Collagenases في المادة البينية للخلايا الطلائية مما يسهل في الانتشار وغزو الأنسجة(7), كما يلعب دورا مهما في إحداث الاخماج الجلدية و يُعتقد بوجود تعاون بينه وبين (Plasminogen-binding group A Streptococcal Protein) أو ما يعرف بالـ PAM الذي يؤدي الى تسهيل غزو البكتريا لأنسجة المضيف وإحداث الاخماج الجلدية (8).

تهدف هذه الدراسة الى التعرف على انتشار جين *sk* في العزلات البكتيرية المختلفة المعزولة من الحالات المرضية .

المواد وطرائق العمل:

اولا: جمع العينات: جُمعت العزلات البكتيرية من مختبرات مستشفى الرمادي العام ومستشفى النسائية والاطفال في مدينة الرمادي ومن حالات مرضية مختلفة (جدول 1) وتم الاعتماد على تشخيص المختبر في تحديد نوع البكتريا.

جدول (1) : انواع واعداد البكتريا المستخدمة في الدراسة

ت	العزلة	العدد
1	*Escherichia coli*	8
2	*Pseudomonas sp.*	2
3	*Streptoccus pneumoniae*	5
4	*Staphylococcus aureus*	2
5	*Klebsilla sp.*	4
6	*Salmonella typhi.*	1

ثانيا: الكشف عن البروتين:

لمعرفة قدرة البكتريا على أنتاج بروتين الستربتوكاينيز تم الاعتماد على فحص الكازين Caesinolytic assay وحسب ما موصوف في Remmert and Cohen (9). حُضرت مزرعة سائلة للعزلات البكتيرية بعمر 18 ساعة, أُخذ من كل مزرعة 1 مل ووضعت في أنبوبة ابندورف سعة 1.5 مل وحُطمت الخلايا بجهاز الموجات فوق الصوتية Sonicetor (Qsonica, USA), وأستُخدم جزء من المزرعة المتحللة في اختبار الكازين. مُزج 36 مل من محلول الدارئ (50 mMTris– HCL \ 150 mM NaCl) مع 400 ملغم من الاكاروز وبعد إتمام عملية الإذابة بواسطة الحرارة أُضيف 2 مل الحليب الساخن مع 1 مل من بلازما الدم, مُزجت جيدا وصُبت في طبق بتري وتُركت الى ان تتصلب, تم بعدها عمل حفر في الهلام المتصلب وحُمل 50 مايكرو ليتر من كل مزرعة سائلة متحللة وحُضنت لمدة 18 ساعة بدرجة 37 مئوية. تم ملاحظة وجود منطقة شفافة حول الحفرة كدليل على فعالية البروتين.

ثالثا: عزل البلازميد:

اعتمدت طريقة التحلل القاعدي Alkaline lysis method الموصوفة من قبل Harris et al (10) لعزل البلازميدات من العزلات التي أظهرت نتيجة موجبة في اختبار تحلل الكازين.

رابعا: بناء جين sk:

تم بناء ومضاعفة جين *sk* عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction(PCR) باستخدام الدنا البلازميدي المعزول من العزلات البكتيرية كقالب وباستخدام بوادئ متخصصة لجين sk (forward:5GGGATTCCATATGATTGCTG)GACCTGA 3و (Reverse:5 CCGGAATTCTTATTTGTCTTTAGG 3) وتمت برمجة الجهاز المدراج الحراري Thermal Cycler (TECHNE TC–3000) وحسب الخطوات التالية 1– مرحلة المسخ الاولي (95°م لمدة 10 دقائق), 2– مرحلة المسخ (95°م \ دقيقة واحدة), 3– مرحلة التصاق البوادئ Annealing (53°م \ دقيقة واحدة), 4– مرحلة الاستطالة (72°م \ دقيقة واحدة), تم تكرار المراحل 2 و 3 و4 لـ 35 دورة ثم تليها المرحلة الرابعة هي مرحلة الاستطالة النهائية بدرجة حرارة 72مئوية ولمدة 10 دقائق ثم تخفض درجة الحرارة الى 5°م في الخطوة الأخيرة. بعد انتهاء التفاعل تم الكشف عن نواتج التفاعل عن طريق ترحيلها على هلام الاكاروز بتركيز 1% ولفترة 40 دقيقة بفرق جهد يبلغ 100 ملي فولت.

النتائج والمناقشة:

اولاً : اختبار الكازين:

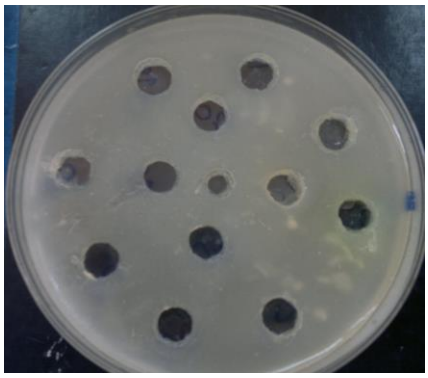
الجدول 2 والشكل 1 يوضح نتائج اختبار الكازين للكشف عن وجود بروتين الستربتوكاينيز بعد فترة حضن 18 ساعة بدرجة حرارة 37 مئوية.

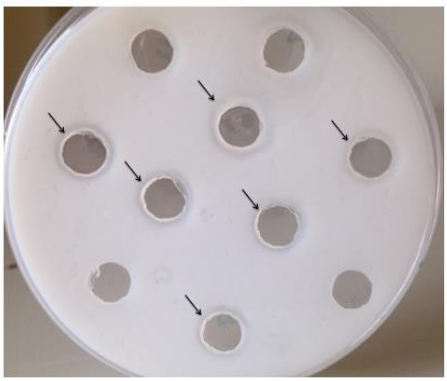
حيث كان ظهور الهالة الشفافة حول الحفرة هي نتيجة موجبة نتيجة لفعالية بروتين الستربتوكاينيز , أظهرت نتائج الاختبار وجود البروتين في عزلة وحدة من Pseudomonas sp وعزلتين من Staphylococcus aureus و خمس عزلات من E. coli وعزلتين من بكتريا streptococcus pneumoiae وعزلتين من بكتريا Klebsilla spp المستخدمة في الدراسة. يعتبر هذا الاختبار من الاختبارات البسيطة والتي تعطي دلالة الى وجود بروتين الستربتوكاينيز حتى لو كان بنسبة قليلة نتيجة لفعاليته بتحليل بروتين الكازين الموجود في الحليب – المشابه في تركيبه للفايبرين – بوجود بلازما الدم مما يؤدي الى تكوين المنطقة الشفافة حول الحفر (11). يستخدم هذا

الاختبار كذلك في اختبار فعالية أنواع أخرى من منشطات مولد البلازمين.

جدول (2) نتائج اختبار الكازئين للعزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة

العزلة	الرقم	النتيجة
Pseudomonas sp	1	_
Pseudomonas sp.	2	+
Staphylococcus aureus	3	+
Staphylococcus aureus	4	+
E. coli	5	+
E. coli	6	_
E. coli	7	+
E. coli	8	_
E. coli	9	+
E. coli	10	+
E. coli	11	+
E. coli	12	_
Streptococcus pneumoniae	13	_
Streptococcus pneumoniae	14	_
Streptococcus pneumonia	15	_
Streptococcus pneumonia	16	+
Streptococcus pneumonia	17	+
Klebsilla sp.	18	+
Klebsilla sp.	19	_
Klebsilla sp.	20	_
Klebsilla sp.	21	+
Salmonella typhi	22	_

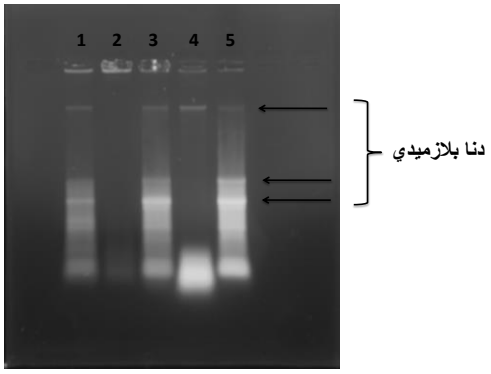




شكل 1: نتيجة اختبار الكازين , تكون الهالة الشفافة حول الحفرة (مشار اليها بالاسهم)

ثانيا : عزل الدنا البلازميدي

تم الحصول على الدنا البلازميدي بعد عزله بطريقة التحلل القاعدي Alkaline lyses method لاستخدامه كقالب في عملية الكشف عن وجود الجين المشفر للستربتوكاينيز من العزلات البكتيرية التي اظهرت نتيجة موجبة في اختبار الكازين بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل. ويظهر الشكل 2 الحزم البلازميدية بعد اجراء عملية الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز بتركيز 0.8%.



شكل 2: الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي المعزول من بعض العزلات المرضية المستخدمة في الدراسة

ثالثا: تفاعل البلمرة المتسلسل

بعد اكمال تفاعل الدنا المتسلسل PCR بالظروف التي تم شرحها مسبقا (طرائق العمل) وباستخدام بوادئ متخصصة لبناء جين *sk* المشفر لبروتين الستربتوكاينيز وللعزلات البكتيرية التي تم استخلاص الدنا البلازميدي لها واستخدامه كقالب لبناء الجين الذي يبلغ حجمه 1.3 كيلو زوج قاعدي وترحيل ناتج التفاعل كهربائيا وعلى هلام الاكاروز بتركيز 1%, كانت النتائج المستحصلة هي بناء القطعة المطلوبة من الدنا هي من عزلتين فقط وباستخدام درجة حرارة 53 مئوية والعزلتين كانت تعودان لـ *E. coli* رقم 11 و 12 فقط (شكل 3) في حين لم يتم بناء قطعة دنا مشابهة من العزلات البكتيرية الأخرى التي أعطت نتيجة موجبة في اختبار الكازين.

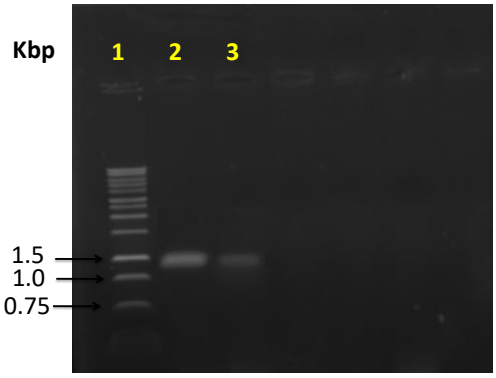
P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2012 ,(6), (3) :25-29

شكل 3 :الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل لجين sk المشفر لبروتين الستربتوكاينيز , 1– الدليل الحجمي للدنا 2– E. coli 10 , 3– E. coli 11.

في هذه الدراسة, من مجموع 12 عزلة بكتيرية أعطت نتيجة موجبة في الاختبار الأولي لفعالية البروتين, تم الحصول على جين *sk* من عزلتين فقط تعود الى *E. coli* بعد مضاعفته بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل وباستخدام بوادئ متخصصة للجين المطلوب. وعلى الرغم من ان جين *sk* قد تم عزله من بكتريا *streptococcus equisimilis* لاول مرة (4), إلا إن بعض الدراسات قد أشارت الى تشخيص الجين المشفرة للستربتوكاينيز في أجناس بكتيريا وفطريات مختلفة مثل: *pseudomonas sp.*, *Micrococcus luteus* , *Candida albicans* , *Aspergillus oryzae* (12).

قد يعزى عدم الحصول على جين *sk* من أجناس الـ *Streptococcus* التي استخدمت في هذه الدراسة هو إن موقع الجين المطلوب في تلك الاجناس البكتيرية يكون على الكروموسوم وليس على البلازميد (13), وقد تكون النتيجة الموجبة لاختبار الكازين لبعض أجناس البكتيريا المستخدمة في الدراسة ناتجة عن فعالية بروتين Staphylokinase الذي تنتجه بكتريا *Staphylococcus* , وهو من البروتينات المستخدمة كمنشط لمولد البلازمين المتخصصة للفايبرين (14) إذ تم الحصول على نتيجة موجبة في اختبار الكازين الا انه لم يتم الحصول على جين *sk* بعملية تضاعف البلمرة المتسلسل

المصادر:



1- Malke H. and Ferretti J.J. (1984), 'Streptokinase: cloning, expression and excretion by Escherichia coli', Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 81, pp. 3557-3561.
2- Bajaj A.P. and Castellino F.J. (1977), 'Activation of human plasminogen by equimolar levels of streptokinase', J. Biol. Chem., Vol. 252, pp. 492-498.
3- Reddy K.K.N. (1980), 'Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase', In: Kline D.L. and Reddy K.K.N. (Eds.), Fibrinolysis, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 71-94.
4- Tillett W.S. and Garner R.L. (1933), 'Fibrinolytic activity of hemolytic streptococci', J. Exp. Med., Vol. 58, pp. 485-502.
5- Jackson K.W. and Tang J. (1982), 'Complete amino acid sequence of streptokinase and its homology with serine proteases', Biochemistry, Vol. 21, pp. 6620-6625.
6- Baruah D.B., Dash R.N., Chaudhari M.R. and Kadam S.S. (2006), 'Plasminogen activators: A comparison', Vascular Pharmacology, Vol. 44, pp. 1-9.
7- Cunningham M. W. (2000), 'Pathogenesis of group A streptococci infections', Clin. Microbiol. Rev., Vol. 13, pp. 470–511.
8- Ringdahl U., Svensson M., Wistedt A. C., Renne T., Kellner R., Muller – Esterl W. and Sjobring U. (1998), 'Molecular co –operation between PAM protein and streptokinase for plasmin acquisition by Streptococcus pyogenes' J. Biol. Chem., Vol. 273. pp 6424–6430.
9- Remmert L.F. and Cohen P.P. (1949), 'Partial purification and properties of a proteolytic enzyme of human serum' J. Biol. Chem., Vol. 181, pp. 431-448.
10- Harris R.J., Gowans E. and Lanser J. (1996), ' Nucleic acid techniques in diagnostic microbiology. In Practical Medical Microbiology. (Eds. By Collee T.G., Mornion B.P., Fraser A.G., and Simmon A.) 14th Edition, Churchill Livingston Ltd. pp 978.
11- Saksela O. (1981), 'Radial caseinolysis in agarose: A simple method for detection of plasminogen activator in the presence of inhibitory substances and serum', Analy. Biocheim., Vol. 111, pp. 276-282.
12- Hao-ping W. Qi-Yi H., Jiang-Yu D. and Jin-Bo L. (2011), 'Advances in Research of Fibrinolytic Enzyme from microorganism' . J. of Chongqing Normal University, Vol. 28(3) pp. 60-63.

14- Collen D. and Lijnen H.R. (1994), 'Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potential?', Blood, Vol. 84, pp. 680-686.

13- Madhuri H., Manohar M., Singh N.A. and Mohanasrinivasan V.(2011), ' Studies on Isolation, Screening and Strain Improvement of Streptokinase Producing β- hemolytic Streptococci' World Journal of Science and Technology, Vol. 1(3), pp. 7-11.

DETECTION OF SK GENE ENCODING STREPTOKINASE IN DIFFERENT PATHOGENIC BACTERIAL ISOLATES

HARITH K. BUNIYA

ABSTRACT

The aim of this study is detection of present sk gene in the different pathogenic bacteria isolates. We collected 22 bacterial isolates from different patients, by ceasinolytic assay we checked the ability of these isolates to produced the streptokinase protein, 12 isolates given positive result in this assay. The plasmid DNA isolated from that strains and used as a template in polymerase chain reaction (PCR) to amplified sk gene by using gene specific primers. From only two E. coli isolates we obtained the 1.3 kb DNA fragment and by agarose gel electrophoresis we determined the DNA fragments size compare with DNA Ladder.