طب‌نظامی
زمستان ۱۳۸٤، شماره۷ (٤)
صفحات: ۳۲۹ -۳۲۱

شناسائی ژن شیگاتوکسین به‌وسیله روش Multiplex PCR

امیر همایون کیهان[۱]*.M.Sc، مجتبی سعادتی[۲]** .Ph.D، احمد کریمی راهجردی[۳]**.M.Sc و مهدی کمالی[۴]**.M.Sc

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... «عج»- بیمارستان قلب جماران-تهران-ایران*

** دانشگاه امام حسین (ع) -دانشکده علوم پایه -گروه علوم زیستی-تهران-ایران*

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸٤/۱۰/۱٤ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۲/۳۱ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۵/۳/۱۱

خلاصه

مقدمه: زیر گونه‌های STEC (Shiga toxin– producing *E. coli*) و بیوتایپ ۱ شیگلا دیسانتری باعث ایجاد اسهال، کولیت هموراژیک و ناهنجاری‌های بدخیم سیستم مجاری ادراری HUS (Hemolytic Uremic Syndrome) در انسان می‌شوند. بسیاری از نشانه‌های کلینیکی این بیماری در اثر تولید شیگا توکسین ۱(Stx Stx1/)، شیگا توکسین ۲ (Stx2) و یا مجموعه‌ای از هر دو نوع توکسین پدید می‌آید. این تحقیق جهت شناسایی ژن این توکسین‌ها به‌وسیله روش ملکولی صورت گرفته است.

مواد و روش کار: برای شناسایی ژن‌های *stx/stx1* و *stx2* تکنیکی براساس Multiplex PCR به همراه ژن مالات دهیدروژناز (*mdh*) موجود در دو باکتری *E. coli* و شیگلا طراحی شده است. مجموعه‌ای از ۶ پرایمر استفاده شده است: SFI وSRI یک قطعه bp ۱۹۹ از ژن *mdh* را تولید می‌کنند که به‌عنوان یک کنترل مثبت (Internal positive control) برای صحت واکنش عمل می‌کند، Ka2Rو Ka2F یک قطعه ۳۸۱pb از ژن *stx2* را تولید و Ka1F و Ka1R یک قطعه ۶۲۲pb از ژن *stx/stx1* را تولید کنند. جهت تایید محصولات واکنش از فرآیند هضم آنزیمی و تعیین توالی استفاده شد.

نتایج: محصولات PCR ژن‌های *stx/stx1* و *stx2* و *mdh* تنها در *E. coli* O157:H7 به‌طور هم‌زمان مشاهده شد و در بیوتایپ ۱ شیگلا دیسانتری تنها قطعه مربوط به *stx/stx1* و*mdh* مشاهده گردید. در ژنوم تخلیص شده از دیگر باکتری‌های گرم منفی قطعات مربوط به توکسین مشاهده نشد. فرآیند هضم آنزیمی و تعیین توالی صحت قطعات تکثیر شده را مورد تایید قرار داد. حساسیت واکنش PCR برای شناسایی ژن شیگا توکسین ۲/۱pg/µl از ژنوم باکتری و معادل ۳۲۰ cfu/µl بود.

بحث: واکنش طراحی شده قادر به شناسایی ژن‌های *stx2, stx/stx1* و*mdh* می‌باشد. *E. coli* O157:H7 قادر به تولید هر دو نوع شیگا توکسین و بیوتیپ ۱ شیگلا دیسانتری تنها قادر به تولید نوع ۱ شیگا توکسین می‌باشند. با بررسی‌های انجام شده بر روی قطعات تکثیر شده و مقایسه آن‌ها با بانک ژنوم مشخص شد که قطعه در نظر گرفته شده برای تکثیر *stx2* در تمامی انواع این ژن وجود دارد، در نتیجه جهت شناسایی آن‌ها مناسب می‌باشد. این روش وسیله‌ای مناسب جهت تشخیص انواع شیگا توکسین‌ها می‌باشد چرا که سریع، اختصاصی، حساس و ارزان می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: شیگا توکسین، شیگلادیسانتری، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندتایی، اسهال

۱- کارشناس ارشد- بیمارستان جماران- نویسنده مسئول
۲- استادیار- دانشگاه امام حسین(ع)
۳- کارشناس ارشد- دانشگاه امام حسین(ع)
۴- کارشناس ارشد- دانشگاه امام حسین(ع)