



ISMJ 2014; 17(3): 263-271

دوماهنامه طب جنوب

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال هفدهم، شماره ۳، صفحه ۲۷۱ - ۲۶۳ (مرداد و شهریور ۱۳۹۳)

ارزیابی حفاظت در ترادف ژن *card* و استفاده از آن در

تشخیص سریع مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

مینا پیراینده^۱، راضیه نظری^۱، محمدرضا ذوالفقاری^۱، محمد ارجمندزادگان^{۲*}، اعظم احمدی^۳،
مانا شجاع پور^۴، فریبا رجبی^۵

^۱ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، قم، ایران

^۲ مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان و گروه ایمنی شناسی و میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۳ مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۴ مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۵ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

(دریافت مقاله: ۹۱/۳/۱۷ - پذیرش مقاله: ۹۱/۵/۲۵)

چکیده

زمینه: سرعت رشد سلولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وابسته به رونویسی rRNA است که در مایکوباکتریوم توسط ژن *card* کنترل می‌شود. هدف این تحقیق، ارزیابی حفاظت در ترادف ژن *card* و استفاده از آن در تشخیص سریع سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی متفاوت است.

مواد و روش‌ها: ژنوم تخلیص شده ۳۸ سویه بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با الگوی مقاومت دارویی مختلف انتخاب شدند. پرایمرهای مورد نظر، با تعیین ژن‌های بالادست و پایین دست جهت تکثیر کامل ژن *card* طراحی و با نرم‌افزارهای مربوطه ارزیابی شدند. با محاسبه دمای ذوب، دمای اتصال و برنامه PCR تنظیم شد. وجود ژن تکثیر شده با کمک الکتروفورز تأیید گردید. ژن، خالص‌سازی شده و مورد سکانس (توالی یابی) قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی نتایج تعیین توالی نشان داد که ژن *card* در نمونه‌های مختلف کلینیکی و سویه استاندارد، یکسان بوده و الگوی مشابهی دارد. در این تحقیق مشخص گردید که دامین TRCF در منطقه N ترمینال پروتئین *card* در سویه‌های مورد مطالعه کاملاً حفاظت شده است.

نتیجه‌گیری: این تحقیق، اولین مطالعه روی ژن *card* در سویه‌های بالینی می‌باشد. نتیجه سکانس، تعیین کننده وجود حفاظت در این ژن بود. با توجه به اهمیت این ژن در زندگی باکتری و عدم تغییر در توالی آن، در مطالعات آینده این ژن به‌عنوان هدفی مناسب برای تشخیص سریع و نیز طراحی یک مهار کننده ضد مایکوباکتریوم پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ژن *Card*، سکوانس.

* اراک، مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان، گروه میکروبی‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک

مقدمه

حدود یک سوم جمعیت جهان (۲ میلیارد نفر) آلوده به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند و سالانه ۱۰ میلیون مورد جدید سل بروز می‌کند. هم اکنون بیش از ۲۰ میلیون نفر به بیماری سل فعال مبتلا هستند (۱).

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بیش از هر عامل عفونی دیگری منجر به مرگ می‌شود. کشورهای اروپایی ۲۳ درصد از موارد جدید را گزارش می‌دهند و قزاقستان، روسیه، رومانی، ترکیه، اکراین و ازبکستان ۷۳ درصد بقیه را تشکیل می‌دهند (۲).

طی سال‌های اخیر، بروز و گسترش مقاومت دارویی، بیماری سل را در ردیف ایدز و هیپاتیت در اولویت‌های سازمان بهداشت جهانی قرار داده است. سل ایجاد شده در اثر سوش‌های حساس به دارو، در صورت درمان مناسب، در تقریباً تمام موارد قابل معالجه است و در صورتی که درمان نشود ممکن است در ۵۰ تا ۶۵ درصد از موارد، در عرض ۵ سال منجر به مرگ گردد (۱).

استالینگ و استفانو (Stallings & Stephanou) پروتئین *Card* را در سال ۲۰۰۹ شناسایی کردند. *Card* یک پروتئین واکنش دهنده با RNAP است که رونویسی rRNA را در مایکوباکتریوم تحت شرایط معمول و نیز استرس‌های سلولی گوناگون شامل گرسنگی، آسیب DNA و استرس اکسیداتیو کنترل می‌کند (۳).

Card در آرکئی باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها وجود ندارد. عملکرد این پروتئین در مایکوباکتریوم شبیه به *DksA* در *E. coli* است با یک تفاوت که *Card* تحت همه شرایط ضروری است ولی *DksA* در *E. coli* در محیط‌های کشت غنی مغذی غیرضروری می‌باشد (۹، ۱۰، ۱۴ و ۱۵). پروتئین *Card* در

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم اسمگماتیس با پروتئین‌های کد شده به وسیله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس Rv3583c و مایکوباکتریوم لپرا MI0320 تشابهی به میزان به ترتیب ۹۸/۱ و ۹۵/۷ درصد دارد (۱۲ و ۱۴). در صورت آسیب DNA و نبود مواد غذایی رونویسی *Card* به صورت بالا دستی تنظیم می‌شود، فقدان *Card* باعث افزایش حساسیت تا ۵۰۰۰۰ برابر به ۱۰mM هیدروژن پر اکسید و سیپروفلوکساسین می‌شود (۵) و (۱۴). استالینگ و گلیکمن (Glickman) نشان دادند که با توجه به نقشه رونویسی کل ژنوم، *Card* مستقیماً متصل به RNAP بوده و نقص در این پروتئین سبب انباشته شدن mRNAهای کدکننده پروتئین‌های ریبوزومی همچین RNAهای ریبوزومی می‌شود (۱۴). پروتئین *Card* کد شده به وسیله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس rv3583c دارای ۱۶۲ آمینو اسید در ابتدای سکانس و شامل یک N-ترمینال موتیف مشابه RNAP است (۶، ۸، ۱۴ و ۱۵).

دامین یا ناحیه پروتئین بخشی از توالی و ساختار پروتئین است که می‌تواند به صورت مستقل از بقیه زنجیره پروتئین عملکرد داشته باشد. هر دامنه یک ساختار سه بعدی را تشکیل می‌دهد که اغلب می‌تواند به طور مستقل تا خورده و نیز پایدار باشد. بسیاری از پروتئین‌ها دارای دامنه‌های ساختاری گوناگون هستند (۱۶).

از طرف دیگر دامین‌ها توالی‌های نسبتاً طولانی حفاظت شده هستند که در ژن‌ها یا پروتئین‌های مشابه در باکتری‌های مختلف توالی نسبتاً مشابهی دارند. یک دومین یک واحد ساختمانی مستقل در

ژن‌های بالادست و پایین دست انتخاب می‌شدند. ژن *ispD* در Down-Stream ژن مورد مطالعه (*CarD – Rv3583c*) قرار دارد.

ژن *ispD* در منطقه 4024344-4025039 و ژن *CarD* در 4025056-4025544 نوکلئوتیدی ژنوم مایکوباکتریوم واقع شده است. فاصله موجود بین دو ژن (یعنی بین نوکلئوتید پایانی ژن *ispD* 4025039 و نوکلئوتید آغازین ژن *CarD*، 4025056) شامل: CCGCCCTGAGGCTCTAG می‌باشد که به‌عنوان پرایمر R انتخاب شد.

برای طراحی پرایمر F، فاصله بین ژن *ipqE* و ژن مورد مطالعه با کمک Blast نوکلئوتیدی تعیین گردید. بخشی از فاصله میان 4025545-4025829 که احتمالاً پرایمر ژن *CarD* می‌باشد، به‌عنوان پرایمر F انتخاب شد.

عملاً وضعیت این سه ژن به ترتیب زیر است:

ispD:4024344-4025039/*CarD*(4025056-4025544)/promotor(4025545-025829)/*IpqE* (4025830- 4026378)

برای افزایش دقت عملکردی این پرایمرها، نکات اصلی در طراحی پرایمر شامل موارد زیر در نظر گرفته شده و با کاهش و افزایش نوکلئوتیدها بهترین ترادف‌ها انتخاب گردیدند: طول پرایمر، درصد GC بین ۶۰-۴۵، دلتا G پرایمر، جلوگیری از تشکیل ساختارهای سنجاق سری، ممانعت از انتهای چسبان، افزایش درصد C یا A در انتهای ۳ پرایمر، افزایش درصد AT در ۳، پرهیز از (3')...GATC(5') و نیز (3')...AC...GT (5')، تشابه درصد GC در F و R، انتخاب دمای ذوب بین ۷۰-۶۵ و تشابه آن در هر دو پرایمر و نهایتاً انتخاب دمای Annealing بر اساس دمای ذوب. پرایمرهای انتخاب شده (به‌صورت ۳-۵) به‌قرار زیر هستند:

F:5-CGAAAGGGGCTCAAATCAGA-3

پروتئین‌ها است که کار خاصی را به‌عهده دارد و معمولاً به‌همراه تکرارها و دومین‌های دیگر پیدا می‌شود (۱۶ و ۱۷).

موارد معمول موتیف شامل: *helix-loop*، *coiled-coil*، *leucine zipper*، *zinc finger* و غیره است. هدف این بررسی ارزیابی حفاظت در ترادف ژن *CarD* و استفاده از آن در تشخیص سریع مایکوباکتریوم تویرکلوزیس با مقاومت آنتی‌بیوتیکی متفاوت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های مورد مطالعه

در این تحقیق، DNA جمعاً ۳۸ سویه از بانک DNA آزمایشگاه زیستی مولکولی مرکز تحقیقات سل و عفونی کودکان دانشگاه علوم پزشکی اراک مورد استفاده قرار گرفتند. این مجموعه از سویه‌های مایکوباکتریوم تویرکلوزیس که از بیماران مسلول با مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به داروهای خط اول درمان سل شامل (ایزونیازید، ریفامپیسین، پیرازینامید و اتامباتول) و تعدادی از داروهای خط دوم درمان شامل (فلوروکینولون‌ها)، داروهای تزریقی کانامایسین و آمیکاسین جدا شده‌اند، استخراج گردیده‌اند همچنین از سویه استاندارد H37Rv استفاده شد.

طراحی پرایمر

با توجه به هدف اصلی تحقیق که تعیین ترادف و بررسی موتاسیون‌های احتمالی ژن *CarD* می‌باشد، پرایمرها می‌باید به گونه‌ای طراحی می‌شدند که تمام ORF ژن را در آمپلی فیکاسیون تکثیر نمایند.

بدین منظور از Blast، Gene bank و نرم‌افزارهای Mega و Integrated DNA Technology به‌شرح زیر استفاده به‌عمل آمد: پرایمرها باید از بخشی از

R:5-TAGAGCCTCAGGGCGGTCAAGA-3

انجام PCR

واکنش آمپلیفیکاسیون در حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر حاوی (۱۰ نانوگرم DNA استخراج شده، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر از dNTPs، ۱ واحد آنزیم Taq پلی‌مراز و ۱ میکرولیتر بافر (X1)، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم) انجام گردید. چرخه حرارتی برای آمپلیفیکاسیون^۱ ژن *Card* شامل دمای اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه، ۴۰ سیکل به صورت ۹۴ درجه سانتی-گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، دمای پایانی ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۷ دقیقه استفاده گردید.

الکتروفورز

بررسی وجود ژن تکثیر شده با انجام ژل الکتروفورز روی آگارز انجام پذیرفت. در این روش از آگارز ۱ درصد به همراه ماده آشکارساز Safe Stain استفاده به عمل آمد.

تعیین توالی (DNA Sequencing)

محصول PCR جهت تخلیص با روش ستونی و نیز تعیین توالی با دستگاه Applied Biosystem به شرکت Source BioScience انگلستان ارسال گردیده و با کمک دو پرایمر F و R سکوئنس شدند. نتیجه تعیین توالی با کمک نرم‌افزار Mega تحلیل و در Gene Bank با ژن اصلی Blast و منطبق گردیدند.

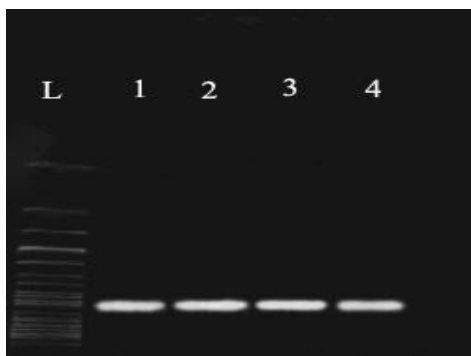
یافته‌ها**سویه‌های مورد مطالعه**

باکتری‌هایی با حساسیت آنتی‌بیوتیکی مختلف در این بررسی با هدف پوشش‌دهی انواع سویه‌های جدا شده از بیماران، انتخاب گردیدند.

نتایج PCR

محصول PCR ژن *Card* قطعه ۵۲۴bp است که شامل ۴۸۹ نوکلئوتید ژن *Card* و مابقی متعلق به پرایمرهای واقع شده در مناطق بین ژن مورد مطالعه و ژن‌های *ispD* و *ipqE* در بالادست و پائین دست ژن می‌باشند.

توالی تکثیر شده این قطعه در نمونه‌های مختلف، یکسان بوده و الگوهای یکسانی را نشان می‌دهد. این یافته‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. این مسئله صحت طراحی منطقه انتخاب شده و نیز محاسبه صحیح برنامه PCR را اثبات نمود.



شکل ۱) ژل الکتروفورز قطعه ۵۲۴bp حاصل از ژن *card*

نتایج توالی یابی^۲

اجرای توالی یابی (سکوئسینگ) ژن *Card* در سویه‌های مورد مطالعه، توالی یکسانی را ارائه نمود (شکل ۲).

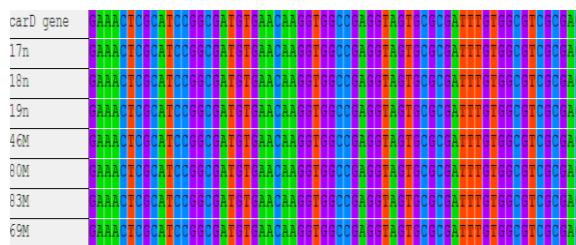
² sequencing

¹ amplification

اهمیت این ژن در بقای باکتری پیش از این توسط استالین در سال (۲۰۰۹) بررسی شد و توالی ژن در سویه استاندارد با باکتری‌های دیگر مورد مقایسه قرار گرفته بود (۱۴). این محقق حفاظتی بودن این ژن را در قیاس با سایر باکتری‌ها تأیید نمود. با این حال پس از آن هیچ مطالعه منتشر شده‌ای مبتنی بر هر گونه مطالعه روی سویه‌های بالینی یافت نشد. *Card* پروتئینی است که رونویسی rRNA را در مایکوباکتریوم تحت شرایط معمول و نیز در استرس‌های سلولی گوناگون از جمله گرسنگی، آسیب DNA و استرس اکسیداتیو کنترل می‌کند (۱۴-۱۲).

پروتئین *Card* مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به‌وسیله ژن *rv3583c* کد شده و دارای ۱۶۲ آمینواسید می‌باشد. از نظر ساختاری، در ناحیه N ترمینال دامین این پروتئین، موتیفی مشابه با RNAPol (RNAP) وجود دارد که این دامین^۳ به دامین رونویسی دیگری به نام TRCF متصل می‌شود. علاوه بر این، دامین مذکور به‌طور مستقیم به ناحیه N ترمینال دامین زیر واحد β از RNAP متصل می‌گردد (۷، ۸ و ۱۴).

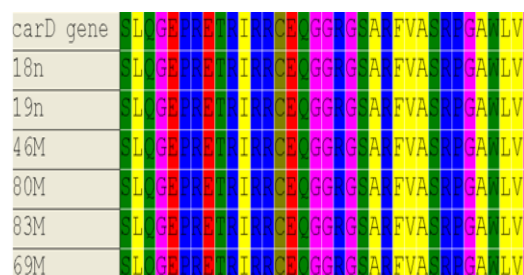
(The bacterial transcription-repair coupling factor) TRCF توسط ژن *mfd* کد شده و خواص زیستی گوناگونی ارائه می‌نماید. مکانیسم TCR یا ترمیم همراه با کپی‌برداری (Transcription-coupled repair) یک مکانیسم ترمیم DNA است که هنگام کپی‌برداری کنترل و اجرا می‌شود. این فرایند در باکتری‌ها با TRCF انجام می‌شود. TRCF نوعی ATPase است که با انرژی حاصل از هیدرولیز ATP باعث انتقال RNA پلی‌مراز در حباب کپی‌برداری در بالادست dsDNA می‌گردد. TRCF به UvrA و RNAP (RNA پلی‌مراز)، DNA



شکل ۲) نتیجه اجرای سکونس ژن *Card* در سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم و حساس به دارو. انطباق کامل نوکلئوتیدی در تمام سویه‌ها در نرم افزار Mega قابل مشاهده است.

بررسی نتایج سکونس ژن *Card* عدم وجود موتاسیون در این ژن را در سویه‌های کلینیکی MDR مورد مطالعه اثبات نمود. در نتیجه می‌توان نتیجه گرفت که این ژن در سویه‌های بالینی جدا شده از بیماران، حفاظت شده است.

در شکل ۳ منطقه TRCF در ناحیه N ترمینال پروتئین *Card* که حفاظت شدگی آن در تعدادی از سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم و حساس به دارو با کمک نرم‌افزار Mega نشان داده شده است. منطقه مورد نظر پس از کدن آغازین (متیونین) از F شروع شده و به V ختم می‌شود.



شکل ۳. منطقه TRCF در ناحیه N ترمینال پروتئین *Card* که در تعدادی از سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حفاظت شدگی آن توسط برنامه MEGA4 نشان داده شده است

بحث

در این بررسی برای نخستین بار، ترادف ژن *Card* در سویه‌های بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با حساسیت آنتی‌بیوتیکی مختلف مورد بررسی قرار گرفت و حفاظت کامل آن تأیید گردید.

³ domain

ضروری است (۱۴). این ناحیه حاوی ساختار موتیفی خاصی تحت عنوان زیپر لوسین (*ZL* (zipper leucine) است.

این ساختار یکی از چهار نوع ساختاری است که فاکتورهای رونویسی دارند (این چهار ساختار عبارتند از: *ZF*, *ZL*, *HTH*, *HLH*) در ساختار *ZL* که معمولاً به صورت دایمر عمل می‌کند، زنجیرهای جانبی آبگریز اسید آمینه‌های لوسین به صورت زیپی در ساختاری به صورت دایمر با ساختار مشابه روی ناحیه پروموتوری دایمر *DNA* ژن‌های *tRNA* قرار گرفته و پس از قرارگیری سایر فاکتورهای رونویسی و نهایتاً اتصال *RNAPOL* و باز شدن دو رشته *DNA* فرآیند نسخه‌برداری صورت می‌گیرد. بدین ترتیب منجر به تنظیم و فعال شدن رونویسی این ژن‌ها می‌گردد.

بنابراین پروتئین *Card* یک فاکتور رونویسی (*Transcription Factor*) محسوب می‌شود. با توجه به اهمیت این ژن‌ها (ژن‌های *tRNA*) و قرارگیری آن‌ها به عنوان جزئی از ساختار ریبوزوم، حذف پروتئینی مانند *Card* منجر به عدم فعالیت ترجمه شده و بقای میکروارگانسیم توپرکلوزیس به خطر می‌افتد. بنابراین این پروتئین اهمیت ویژه‌ای در تولید پروتئین و حیات باکتری دارد.

بدین‌گونه بر اساس نتایج این بررسی و اثبات ساختار یکسان این پروتئین در سویه‌هایی که عامل بیماری سل در جامعه هستند و عدم رخداد موتاسیون در آن، امکان طراحی یک مهار کننده برای این ساختار ثابت و بدون تغییر وجود دارد. این مهار کننده با کنترل فعالیت ساختار سوم پروتئینی *Card*، به کنترل رشد باکتری در بدن و مهار بیماری کمک خواهد کرد.

باید دقت نمود که در هم اکنون با توجه به بروز سل مقاوم به دارو، داروهای معمول در رژیم‌های درمانی سل

متصل شده و دو عملکرد مشخص دارد: به حرکت در آوردن کمپلکس سه‌گانه طویل ساز *RNA* پلی‌مراز و استفاده از *Uvr(A)BC* *excinuclease* برای ترمیم اشتباهات است (۱۸).

در این تحقیق مشخص گردید که دامین *TRCF* در سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توپرکلوزیس کاملاً حفاظت شده است. این منطقه در شکل ۳ (منطقه *N* ترمینال پروتئین *Card*) از *F* تا *V* مشخص شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود ناحیه *N* ترمینال این پروتئین ترادف اسید آمینه‌ای مشابه *TRCF* نشان می‌دهد (۱۸).

با توجه به ضرورت حضور ۵ زیر واحد آنزیم *RNAPOL* ($\alpha\beta\beta'\sigma$) در پروتئین *Card* جهت انجام فرآیند نسخه‌برداری، نیاز به وجود ساختار حفاظت شده این پروتئین قابل درک است که در این مطالعه *conservative* بودن ساختار این پروتئین و عدم رخداد موتاسیون در سویه‌های جدا شده از بیماران به اثبات رسید.

با *Multiple Alignment* کردن توالی‌های به دست آمده در این تحقیق، یک سری نواحی خاص روی توالی‌های پروتئینی *Card* مشخص گردید. این توالی‌ها چه در ساختار و چه در توالی‌شان، از این لحاظ که باعث به وجود آمدن یک سری جایگاه‌های عملیاتی یا ویژگی چسبندگی و یا فعالیت‌های آنزیمی شده‌اند، و یا در شکل‌گیری ساختار سوم آن پروتئین نقش داشتند، اهمیت دارند (شکل ۳).

به علاوه، این پروتئین یک تنظیم کننده ضروری برای رونویسی ژن‌های *tRNA* بوده و نقش تنظیم‌کنندگی خود را احتمالاً با واسطه ناحیه *C*-ترمینال دامین انجام می‌دهد. اثبات شده است که ناحیه *C*-ترمینال *Card* برای حیات مایکوباکتریوم و عملکرد این پروتئین

جهت مهار رشد باکتری و کنترل بیماری اقدام نمود.

سپاس و قدردانی

این مقاله جدا شده از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک و همچنین بخشی از پایان‌نامه دانشجویی سرکار خانم مینا پیراینده دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم می‌باشد.

بنابراین بدین‌وسیله از یاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک جهت تأمین هزینه و امکانات و همچنین همه همکارانی که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند، قدردانی می‌نماییم.

پاسخگو نبوده و طول درمان، میزان موفقیت آن و هزینه‌ها کاملاً تغییر کرده‌اند (۱۱ و ۱۹). به‌همین دلیل در این مطالعه، به‌دلیل محدودیت بررسی تمرکز اصلی روی سویه‌های مقاوم به دارو (MDR) معطوف گردید و می‌توان این داده‌ها را برای سایر مطالعات نیز تعمیم داد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت این ژن در حیات باکتری و حفاظتی بودن (Highly conservative) آن در قیاس با سایر باکتری‌ها و نیز سویه‌های بالینی مقاوم و حساس به داروی مورد مطالعه در این بررسی، پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده با یافتن مهار کننده مناسب (Inhibitor) برای پروتئین حفاظت شده *CarD*.

References:

1. Dye C, Scheele S, Dolin P, et al. Consensus statement global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999; 282: 677-86.
2. Arjomandzadegan M, Sadrnia M, Surkova LK, et al. Study of Promoter and structural Gene sequence of *whiB7* in MDR and XDR forms of Mycobacterium Tuberculosis. West Indian Med J 2011; 60 :251-6.
3. Boshoff HI, Reed MB, Barry CE 3rd, et al. DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Cell 2003; 113: 183-93.
4. Branny P, Pearson JP, Pesci EC, et al. Inhibition of quorum sensing by a Pseudomonas aeruginosa *dksA* homologue. J Bacteriol 2001; 183: 1531-9.
5. Cayuela ML, Elias-Arnanz M, Penalver-Mellado M, et al. The Stigmatella aurantiaca homolog of Myxococcus Xanthus high-mobility-group A-type transcription factor *CarD*: insights into the functional modules of *CarD* and their distribution in bacteria. J Bacteriol 2003; 185: 3527-37.
6. Chambers AL, Smith AJ, Savery NJ. A DNA translocation motif in the bacterial transcription-repair coupling factor, Mfd. Nucleic Acids Res 2003; 31: 6409-18.
7. Dove SL, Joung JK, Hochschild A. Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts. Nature 1997; 386: 627-30.
8. Nickels BE. Genetic assays to define and characterize protein-protein interactions involved in gene regulation. Methods 2009; 47: 53-62.
9. Opalka N, Chlenov M, Chacon P, et al. Structure and function of the transcription elongation factor GreB bound to bacterial RNA polymerase. Cell 2003; 114: 335-45.
10. Paul BJ, Barker MM, Ross W, et al. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. Cell 2004; 118: 311-22.
11. Setareh M, Titov LP, Surkova LK. High level association of mutation in KatG315 with MDR and XDR clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis in Belarus. Acta Microbiol Immunol Hung 2009; 56: 313-25.
12. Stallings CL, Glickman MS. *CarD*: a new RNA polymerase modulator in mycobacteria. Transcription 2011; 2: 15-8.
13. Stallings CL, Glickman MS. Is Mycobacterium tuberculosis stressed out? A critical assessment of the genetic evidence.

- Microbes Infect 2010; 12: 1091-101.
14. Stallings CL, Stephanou NC, Chu L, et al. *CarD* is an essential regulator of rRNA transcription required for Mycobacterium tuberculosis persistence. Cell 2009; 138: 146-59.
15. Trautinger BW, Jaktaji RP, Rusakova E, et al. RNA polymerase modulators and DNA repair activities resolve conflicts between DNA replication and transcription. Mol Cell 2005; 19: 247-58.
16. Rosinski JA, Atchley WR. Molecular Evolution of Helix-Turn-Helix Proteins. J Mol Evol 1999; 49: 301-9
17. Ellenberger T. Getting a grip on DNA recognition: structures of the basic region leucine zipper, and the basic region helix-loop-helix DNA-binding domains. Current opinion in structural biology 1994; 4: 12-21.
18. China A, Mishra S, Tare P. et al. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis RNA Polymerase by Binding of a Gre Factor Homolog to the Secondary Channel. J Bacteriol 2012; 194: 1009-17.
19. Mozafari M, Farnia P, Jafarian M, et al. Comparison of Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype with other Mycobacterium tuberculosis strains Using MIRU-VNTR method. ISMJ 2012; 15: 1-12

Original Article

Evaluation of conservation in *carD* sequence's gene and its application in rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*

M. Pirayandeh¹, R. Nazari¹, MR. Zolfaghari¹, M Arjmandzadegan^{2*}, A. Ahmadi³, M shojapoor⁴, F. Rajabi⁵

¹ Department of Microbiology, Qom branch, Islamic Azad University, Qom, IRAN

² Tuberculosis and Pediatric Infectious Research Center and Department of Immunology and Microbiology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN

³ Tuberculosis and Pediatric Infectious Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN

⁴ Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN

⁵ Departments of Microbiology, Medicine School, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN

(Received 6 Jun, 2012 Accepted 15 Aug, 2012)

Abstract

Background: *Mycobacterium tuberculosis* growth rate is closely coupled to rRNA transcription which is regulated through *CarD* gene. The aim of this work was evaluation of conservation in *CarD* gene's sequence and its application in rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*.

Materials and Methods: 38 clinical isolates of *M. tuberculosis* with different types of drug resistance were selected. PCR conditions and annealing temperature were selected by calculating thermal denaturation. Electrophoreses confirmed the presence of the amplified gene. Purified PCR product was sequenced by sequencer.

Results: The size of amplified fragment of *CarD* gene was similar in all samples. By translation of nucleotide code to amino acids it was found that TRCF domain in N-terminal of protein *CarD* was e fully conserved.

Conclusion: This is the first study on the *CarD* gene in clinical isolates of MTB. This gene is recommended for use as a target for designing of suitable inhibitors as anti tuberculosis drug because of its importance in life of *Mycobacterium Tuberculosis* and being a conservative gene.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, *CarD* gene, sequence

*Address for correspondence: Tuberculosis and Pediatric Infectious Research Center and Department of Microbiology, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN, Email: arjomandzadegan@arakmu.ac.ir