

شناسایی، همسانه‌سازی، تعیین توالی ژن *virG* و ایجاد سویه بومی تخفیف‌حده یافته λ Red recombinase با استفاده از سیستم $\Delta virG$

سید مصطفی حسینی^{۱،۵}، مجتبی سعادت^۲، بهار نیری فسایی^۳، تقی زهرایی صالحی^۳، حورا احمدی دانش^۴، مهدی تات^۲ و احسان حسینی^{۶*}

^۱ تهران، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی

^۲ تهران، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، گروه زیست‌شناسی

^۳ تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی

^۴ تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، گروه صنعت و محیط زیست

^۵ تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، باشگاه پژوهشگران جوان

^۶ تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، باشگاه پژوهشگران جوان

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۱

چکیده

باکتری شیگلا و سویه‌های اشرشیا کلی مهاجم روده ای (EIEC) جزء خانواده باکتریهای گرم منفی و عامل مسری‌ترین اسهال باسیلی (شیگلوز) می‌باشند. ژن *virG* یکی از فاکتورهای ضروری در آسیب‌زایی باکتری شیگلا است. پروتئین رمزگذاری شده توسط این ژن، بر روی غشای خارجی (OM) شیگلا قرار گرفته و به خانواده پروتئینهای خود منتقل شونده (Autotransporter) خارج سلولی در باکتریهای گرم منفی تعلق دارد. یکی از روشهای ساخت واکسنهای شیگلا ایجاد تخفیف‌حده در سویه‌های وحشی از طریق جهش‌زایی در ژنهای ویژه آسیب‌زایی باکتری می‌باشد. هدف از این مطالعه شناسایی، همسانه‌سازی و تعیین توالی ژن *virG* و ایجاد سویه زنده تخفیف‌حده یافته $\Delta virG$ با استفاده از سیستم λ Red recombinase در سویه شیگلا دیسانتری تیپ ۱ جدا شده از مبتلایان به شیگلوز بود. در ابتدا با استفاده از آزمایش سرم‌شناسی و واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، گونه و سرووار شیگلای جدا شده از بیمار مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. با توجه به اطلاعات موجود در پایگاه داده‌های ژنومی (NCBI)، آغازگرهای شناسایی ژن *virG* طراحی و پس از تکثیر این ژن، در حامل pGEM-7zf همسانه‌سازی و توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای عمومی حامل انجام گردید. سویه مذکور توسط پلاسمید کمکی pKD46 (حامل ژنهای لازم برای القای نوترکیبی تحت پروموتور آرایینوز) با روش شوک الکتریکی تراریخت گردید. بعد از طراحی آغازگرهای ویژه القای نوترکیبی، واکنش PCR با استفاده از حامل pKD3 (دارای کاست کلرامفنیکل که با توالیهای FRT همجوار شده است) اجرا شد. تراریخت‌سازی کاست آنتی بیوتیکی پس از خالص‌سازی، در سویه شیگلا بومی حامل pKD46 با استفاده از روش شوک الکتریکی انجام شد. سویه جهش‌یافته با جایگزینی کاست کلرامفنیکل با ژن *virG* از طریق وقوع نوترکیبی همولوگ به دست آمد. سپس کاست آنتی بیوتیکی با به کارگیری پلاسمید کمکی pCP20 (حامل آنزیم FLP ریکامیناز) از طریق جایگاه‌های FRT حذف گردید. صحت فرآیند از طریق بررسی خصوصیات فنوتیپی (رشد سویه مقاوم به کلرامفنیکل) و ژنوتیپی (واکنش PCR با آغازگرهای خارجی و سپس توالی‌یابی محصول آن) مورد تأیید قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاصل از تعیین توالی ژن *virG* در مقایسه با سویه استاندارد (با شماره دسترسی CP000035)، هم‌خوانی کامل (۱۰۰ درصد) را تأیید نمود. اطلاعات حاصل از آنالیز بیوانفورماتیکی حذف ۳۲۲۰ جفت باز از ژن *virG* را در سویه جهش‌یافته نشان

داد. استفاده از سیستم λ Red recombinase ایجاد جهش را تسهیل و در مقایسه با سایر روشها مانند حاملهای انتحاری، روشی مؤثر و ارزان تر می باشد.

واژه های کلیدی: شیگلوز، شیگلا دیسانتری تیپ ۱، *virG(icsA)* λ Red recombinase

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۷۲۶۹۷۷۴، پست الکترونیکی: Geneticman2005@gmail.com

مقدمه

باکتری نهایتاً درون یک واکوئل اندوسیتوزی بلعیده شده و سپس با پاره کردن واکوئل به درون سیتوپلاسم سلول پوششی میزبان رها می گردد و پس از تکثیر در آنجا، به کمک پروتئین IcsA (IntraCellular Spreading A)، که به نام VirG نیز شناخته می شود، به سمت سلولهای پوششی مجاور حرکت می کند (۵، ۱۹ و ۲۸). پروتئین VirG از سه بخش تشکیل شده است که بخش انتهایی آن با پروتئین N-WASP میزبان وارد واکنش شده و با فعال کردن کمپلکس Arp2/3 در سیتوپلاسم، موجب پلیمریزه شدن اکتین های گلوبولی به شکل اکتین رشته ای (F-actin) می شود که نتیجه آن، گسترش آلودگی در بدن میزبان است (۳۰). یاخته های شیگلا که دارای نقص در ژن *virG(icsA)* هستند در تمام مدل‌های حیوانی قدرت بیماریزایی کمتری دارند به طوری که در نهایت از طریق جریان گلوبولهای سفید چند هسته ای (PMN)، از بدن میزبان حذف می گردند و بدین نحو عفونت از بین می رود. بنابراین جهش در ژن *virG(icsA)* محور اصلی کاهش بیماریزایی در چندین سویه واکسن تقلیل حدت یافته می باشد (۵).

روشهای مختلفی جهت حذف و غیر فعال نمودن ژنها در باکتریها گزارش شده است که برای درک بیولوژی مولکولی، فیزیولوژی، تنظیم ژنتیکی و بیماریزایی ارگانیسم ها بسیار حائز اهمیت است. روشهای اولیه ای که برای ایجاد سویه های تخفیف حدت یافته به منظور تولید واکسن در باکتری و ویروسهای بیماریزا مورد استفاده قرار می گرفت شامل پاساژ های متوالی و جهش زایی با مواد شیمیایی بود. این روشها فاقد اختصاصیت بودند، به همین دلیل توسط تکنیکهای پیشرفته تر مهندسی ژنتیک و

شیگلا دیسانتری تیپ ۱ باکتری گرم منفی، بی هوازی اختیاری و بدون اسپور می باشد که به خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارد (۱۶). بیماری که توسط شیگلا ایجاد می شود شیگلوز نام دارد. شیگلوز یک بیماری عفونی است که قسمتی از روده کوچک را تحت تأثیر قرار می دهد. شیگلوز با علائمی مانند اسهال آبکی به همراه مقادیر مختلفی از خون و مخاط، تب، حالت تهوع، استفراغ، گرفتگی و درد شکمی تشخیص داده می شود (۳) و (۱۷). در بین گونه های شیگلا، شیگلا دیسانتری تیپ ۱ علاوه بر علائم فوق، از طریق ناهنجاری سیستم اعصاب مرکزی، تشنج و بیماری Hemolytic Uremic (HUS) Syndrom نیز قابل تشخیص می باشد (۱۶).

شیگلا از نظر ژنتیکی بسیار شبیه *اشریشیا کلی* می باشد که گاهی حتی از آن به عنوان *اشریشیا کلی* بیماریزا یاد می شود (۳)، تقریباً ۹۹ درصد عفونت‌های شیگلا در مناطق در حال توسعه رخ می دهد و سالانه حدود ۱/۱ میلیون نفر از مبتلایان به شیگلوز متاسفانه می میرند که ۶۰ درصد آنها را، کودکان زیر ۵ سال تشکیل می دهند (۴، ۱۰).

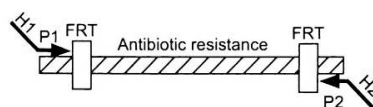
شیگلا پس از ورود به بدن میزبان، ناحیه راست روده و کلون را در دستگاه گوارش هدف قرار می دهد، سپس قادر است این تهاجم را به سلولهای پوششی غیر فاگوسیتی نیز گسترش دهد، این فرآیند از طریق پروتئینهایی صورت می گیرد که در تمام سویه های بیماریزا به شدت حفاظت شده هستند. این پروتئینها توسط یک پلاسمید بزرگ ۲۱۳ کیلوبازی رمز می گردند که از آن به عنوان پلاسمید تهاجمی و یا پلاسمید بیماریزا یاد می شود (۳۱ و ۳۲). هر

PCR و میزبان بیان‌کننده ژنهای سیستم Red پیشنهاد نمودند (۸-۲۳). در واقع این تکنیک، مشابه روشی بود که برای سالهای زیادی در مخمر به کار گرفته می‌شد. این روش ابزار مفیدی را به منظور ایجاد جهشهای هدفمند در باکتریها فراهم می‌آورد و باعث جلوگیری از به کار بردن پلاسمیدهای انتحاری یا دیگر پلاسمیدهای مشابه (حامل سازه‌های ژنی ویژه) می‌گردد. با استفاده از این روش می‌توان سازه‌های ژنی مورد نظر را بر روی پلاسمید یا به طور مستقیم در ژنوم باکتری به صورت *in vivo* از طریق وارد نمودن محصول PCR یا اولیگونوکلوئوتیدهای سنتزی با تکیه بر پدیده نوترکیبی هومولوگ وارد نمود. این امر امکان‌پذیر است، زیرا پروتئینهای مسئول نوترکیبی فازی به طور مؤثری قادرند تنها توالیهای بین ۳۰ تا ۵۰ جفت باز که دارای همخوانی با ژن هدف باشند را، در ژنوم میزبان وارد نمایند (شکل ۱).

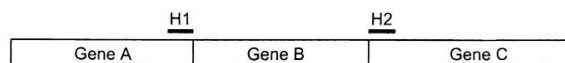
نوترکیبی هومولوگ که بر مبنای حذف هدفمند ژنهای بیمارزا استوارند جایگزین گردیدند که اغلب، از این فرآیندها به عنوان مهندسی ژنتیک معکوس تعبیر می‌شود. یکی از روشهای نسبتاً جدید در مهندسی ژنتیک که اخیراً ظهور پیدا کرده است، استفاده از سیستم نوترکیبی Red (ویژه فاژ لامبدا) در باکتریها می‌باشد (۷، ۸، ۲۳ و ۳۷).

برای مدت زمان زیادی دانشمندان از این نکته آگاهی داشتند که بسیاری از باکتریوفاژها سیستم نوترکیبی هومولوگ مختص به خود را دارا هستند. در سال ۱۹۹۸ مورفی و همکاران نشان دادند که عملکرد ژنهای Red باکتریوفاژ لامبدا، باعث افزایش چشمگیر بازدهی نوترکیبی، در سویه‌های جهش‌یافته در ژنهای *recBC sbcB* یا *recD* می‌گردد (۲۳). در سال ۲۰۰۰ داتسنکو و وائر روشی را برای غیرفعال کردن یک مرحله‌ای ژنهای کروموزومی در سویه *E. coli* K12 از طریق وقوع نوترکیبی بین محصول

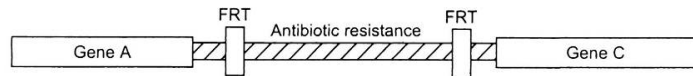
قدم اول. تکثیر ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک که با توالی FRT همجوار شده است.



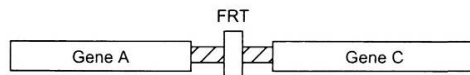
قدم دوم. انجام تراریختی کاست تکثیر یافته در سویه‌ای که ژنهای Red را بیان می‌نماید.



قدم سوم. انتخاب سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک پس از انجام تراریختی



قدم چهارم. حذف کاست آنتی‌بیوتیکی با استفاده از پلاسمید بیان‌کننده آنزیم FLP



شکل ۱- روش ساده ایجاد گسستگی در ژن هدف. نواحی H1 و H2: بازوهای هومولوگ (یکسان) با ژن هدف؛ جایگاههای P1 و P2: به نقاط شروع‌کننده (Priming sites) بر روی پلاسمید pKD3 به کار گرفته شده در روش recombineering اشاره می‌کند (۸).

سیستم، ژنهای سیستم Red دارای نقش ویژه‌ای در افزایش فرکانس نوترکیبی می‌باشند که در ادامه به نقش هر یک از آنها مختصراً اشاره می‌گردد. یکی از پروتئینهای سیستم

در این تکنیک بر خلاف دیگر تکنیکهای رایج مهندسی ژنتیک نیازمند ساخت سازه‌های ژنی با بازوهای هومولوگ طویل (بین ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز) نمی‌باشند. در این

آنتی بیوتیکی، اهمیت پیشرفت روش‌های پیشگیرانه مانند واکسیناسیون افراد و به خصوص کودکان در اولویت سازمان بهداشت جهانی (WHO) قرار دارد (۱). امروزه یکی از مؤثرترین نوع واکسن‌های خوراکی، تهیه سویه‌های مهاجم تخفیف حدت یافته است، که اثرات بالینی قابل قبولی را دارا می‌باشند (۲۵). با توجه به اهمیت و نقش ژن *virG* در سویه شیگلا دیسانتری تیپ ۱، لذا به عنوان ژن هدف در ایجاد گسستگی (حذف) جهت تولید سویه کانید واکسنی بومی انتخاب گردید. هدف از انجام این تحقیق، توالی یابی ژن *virG* و همچنین تهیه سویه زنده تخفیف حدت یافته بر پایه حذف ژن *virG* با استفاده از روش Red recombinase λ در سویه شیگلا دیسانتری تیپ ۱ جدا شده از نمونه‌های بیمارستان‌های میلاد و مفید تهران بود.

مواد و روشها

باکتری شیگلا دیسانتری تیپ ۱ از بیماران مبتلا به اسهال خونی در بیمارستان‌های میلاد و مفید تهران جدا شدند. نمونه‌های تهیه شده، با استفاده از سوآپ‌های استریل در محیط سالمونلا - شیگلا آگار، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت و به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها توسط آزمون‌های بیوشیمیایی اورنیتین دکربوکسیلاز، هکتوئن، زایلوز لایزین دکربوکسیلاز (XLD)، مک کانکی، TSI، ONPG، آزمون تخمیر قند آرابینوز و تولید اندول شناسایی و پس از کشت در محیط LB مایع و افزودن گلیسرول (غلظت نهایی ۲۰ درصد) در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

واکنش آنتی سرمی: سویه‌های شیگلا جدا شده از بیماران پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی، همچنین با استفاده از کیت تشخیصی پلی کلونال گونه‌های شیگلا (شرکت Mast، انگلستان)، تأیید شد. برای این منظور ابتدا سویه‌های شیگلا بر روی محیط مک کانکی آگار کشت داده

Red، پروتئین Exo است. این پروتئین با نقش اگزونوکلازی 3' 5' خود قادر است تا در انتهای کاست خطی وارد شده به درون باکتری، انتهای چسبنده (sticky) ایجاد کند (۷). به دنبال ایجاد ناحیه چسبنده به طول تقریبی بیشتر از ۳۵ نوکلئوتید، پروتئین Beta به عنوان یک SSB (پروتئین‌های متصل شونده به DNA تک رشته ای) عمل کرده و نقش میانجی را در جفت شدن یک رشته با رشته مکمل خود در ژنوم میزبان بازی می‌کند. پروتئین Gam به آنزیم RecBCD باکتری متصل شده و مانع از بین رفتن DNA خطی دو رشته ای وارد شده به باکتری میزبان می‌گردد. این آنزیم در مواقعی که باکتری دچار جهش‌های طولی می‌گردد به کمک زیر واحد‌های خود به انتهای DNA خطی دو رشته ای متصل شده و به کمک سیستم نوترکیبی باکتری این جهش را ترمیم می‌کند (۷-۲۳).

این سیستم اولین بار برای ایجاد تغییراتی در ژنوم باکتری /شرشیا کلی به کار برده شد اما با توجه به مزایای این سیستم در میزبان‌های دیگری نیز مورد استفاده قرار گرفته است، به طور مثال مورنو و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از این روش توانستند در ژن *stxAB* از باکتری /شرشیا کلی K12 جهش ایجاد نمایند. نتایج این تحقیق نشان داد علی‌رغم کارایی و سرعت این روش اما وجود نواحی مرتبط با ژنوم فاژی در کروموزوم /شرشیا کلی باعث ایجاد اختلال در مسیر نوترکیبی می‌گردد (۲۲). کاوروش و همکاران در سال ۲۰۰۰ توانستند با استفاده از تکنیک نوترکیبی در شرایط *in vivo* در قارچ رشته ای *Aspergillus nidulans* با واسطه کاسمید (Cosmid) حامل جهش در ژن *treA* قارچی و با استفاده از پلاسمید pKOBEG جهش ایجاد کنند. این تحقیق نشان داد که این تکنیک روش مناسبی برای ایجاد هم‌جوشی (fusion) و جایگزینی پروموتور در سویه‌های قارچی با فرکانس بیشتر از ۵۰ درصد می‌باشد (۶).

با توجه به بیماریزایی و شیوع نسبتاً بالای شیگلوز در کشورهای در حال توسعه و ناموفق بودن روش‌های درمان

شدند و سپس آزمایشات شناسایی گونه با استفاده از روش آگلوตินاسیون بر روی شیشه اجرا گردید (۲۹).

طراحی آغازگر: به منظور شناسایی سرووار شیگلا جدا شده یک جفت آغازگر اختصاصی برای تشخیص حضور ژن زیر واحد A شیگلا توکسین (*stxA*) با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژنی (شماره دسترسی NC_007606) طراحی و سنتز گردید (سینا کلون، ایران). توالی آغازگر های بالادست و پایین دست تشخیص ژن زیر واحد A شیگلا توکسین عبارت بودند از:

STXF: 5' GGGATAGATCCAGAGGAAGG 3'

STXR: 5' CCGGACACATAGAAGGAAACTC 3'

آغازگر های بالادست و پایین دست ژن *virG* بدون جایگاه برش آنزیمی به منظور همسانه سازی ژن *virG* در حامل pGEM-7zf با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژنی (شماره دسترسی CP000035) طراحی و سنتز گردید (سیناکلون، ایران). توالی آغازگر های بالادست و پایین دست عبارت بودند از:

VRGF: 5' GGGTTTATCAACCACTTACTG 3'

VRGR: 5' GAAATGCAGGACATCAACAC 3'

پس از طراحی و انتخاب آغازگر های فوق، خصوصیات ترمودینامیکی و مولکولی آغازگر ها به وسیله نرم افزار مربوطه (CLC sequence viewer version 6) مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۳). برای این منظور ابتدا توالی کامل ژنهای *virG* و *stxA* در نرم افزار وارد گردید و سپس نسبت به انتخاب و طراحی آغازگرهای مناسب اقدام شد.

آماده سازی DNA باکتری: پس از شناسایی اولیه سویه شیگلا دیسانتری نسبت به کشت آن در محیط LB مایع اقدام گردید و نمونه به مدت ۱۸ ساعت در گرم خانه شیکر دار با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. ژنوم باکتری با استفاده از کیت تخلیص ژنومی *AccuPrep* (کره جنوبی، BioNEER) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید و با

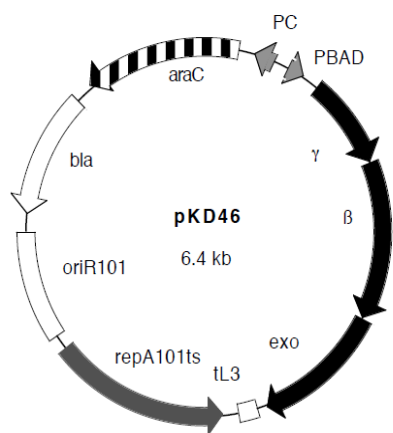
انجام واکنش PCR وجود ژن زیر واحد A شیگلا توکسین و نیز ژن *virG* مورد تأیید قرار گرفت.

تکنیک ژن زیر واحد A شیگلا توکسین باکتری شیگلا: DNA به دست آمده از مرحله قبل، به کمک واکنش PCR و آغازگر های اختصاصی سرووار شیگلا دیسانتری تیپ ۱ تکثیر شد. واکنش PCR به منظور تکثیر DNA در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۰/۴ میکرومول از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط نوکلئوتید های dATP، dCTP، dGTP، dTTP و ۲/۵ واحد از آنزیم DNA پلی مراز *Pfu*، ۵ میکرولیتر از بافر x ۱۰ MgCl₂ با غلظت نهایی ۲/۵ میلی مولار و ۵۰ نانوگرم از DNA تهیه شده، بود. چرخه های PCR شامل مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و دوره سه مرحله ای شامل واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طولی سازی قطعه مورد نظر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و در پایان، مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصول PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد و رنگ آمیزی در اتیدیوم بروماید (با غلظت نهایی ۲۵ میکروگرم در هر میلی لیتر) مورد تأیید قرار گرفت.

تکنیک ژن *virG* و آماده سازی محصول PCR: به منظور همسانه سازی ژن *virG* در حامل pGEM-7zf (Ins T/A) دستورالعمل PCR Product Cloning Kit; Promega (clone PCR) دستور العمل PCR مطابق مرحله قبل، اجرا گردید با این تفاوت که مدت زمان طولی سازی ۶ دقیقه و ۴۵ ثانیه و دمای اتصال آغازگر ها ۵۵ درجه سانتی گراد انتخاب شد. به منظور آماده سازی محصول PCR، DNA تکثیر شده با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification (Roche, Kit, آلمان) خالص سازی و جهت همسانه سازی برای الحاق آماده گردید.

غربالگری: صحت همسانه سازی پرگنه های حاوی قطعه مورد نظر، به کمک PCR و در نهایت با توالی یابی تأیید گردیدند. برای انجام این کار، پلاسمید باکتری با استفاده از کیت *AccuPrep* (Plasmid Extraction Kit BioNEER) کره جنوبی) استخراج و مطابق روش قبل، واکنش PCR اجرا گردید. پلاسمید های مثبت پس از خالص سازی با استفاده از آغازگر های عمومی M13 حامل و آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* تعیین توالی شدند (شرکت تکاپو زیست، ایران).

بررسی حساسیت و مقاومت سویه شیگلا دیسانتری تیپ ۱ بومی ایران: سویه جدا شده از مبتلایان به شیگلوز پس از تعیین سرووار به منظور ارزیابی حساسیت به آنتی بیوتیکهای آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و کلرامفنیکل (۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر) بر روی محیط LB جامد حاوی این دو آنتی بیوتیک به طور جداگانه کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت انکوبه گردید.



شکل ۲- پلاسمید pKD46 دارای سه پروتئین Beta، Exo و Gam می باشد که تحت پروموتور PBAD قرار گرفته اند و دارای origin (مبدأ) حساس به دما و نیز ژن مقاومت به آمپی سیلین (*bla*) نیز به عنوان ژن گزارشگر می باشد (۸).

انتقال پلاسمید pKD46 به شیگلا: در این مطالعه از حامل pKD46 (داتسکو و وانر، ۲۰۰۰) به عنوان سیستم بیان کننده ژنهای Red (*Beta*، *Exo* و *Gam*) استفاده گردید

آماده سازی حامل pGEM-7zf: هضم آنزیمی حامل pGEM-7zf با استفاده از آنزیم *SmaI* (فرمتاز) در واکنش هضم یک گانه با ۲/۵ میکرولیتر از بافر ۱۰x، ۱۰ میکرولیتر از حامل pGEM-7zf، ۲ میکرولیتر از آنزیم محدود کننده به طوری که حجم واکنش به ۲۵ میکرولیتر برسد، تهیه و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد، تا پس از انجام برش، پلاسمید خطی برش خورده با انتهای صاف ایجاد شود.

الحاق: مخلوط محصول PCR و پلاسمید برش خورده به ترتیب با نسبت ۳ به ۱، تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمادهی گردید و بلافاصله به ظرف یخ منتقل شد و سپس ۲ میکرولیتر از آنزیم لیگاز T₄ و ۵ میکرولیتر از بافر ۱۰x به آن اضافه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. محصول واکنش الحاق توسط کیت (PCR cleanup kit, QIAGEN، آمریکا) به منظور انجام تراریختی استخراج گردید.

تراریختی: پلاسمید های نو ترکیب با روش شوک الکتریکی به سلول مستعد *E. coli* سویه DH5 α منتقل شد. برای این کار ابتدا سلولهای مستعد پذیرنده الکتریکی مطابق روش (سمبروک و همکاران، ۱۹۸۹) تهیه و سپس ۳۰ میکرولیتر از سلول مستعد با ۵ میکرولیتر از پلاسمید نو ترکیب pGEM*virG* مخلوط و به مدت ۱ دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند. مخلوط تهیه شده سپس به درون کووت ۰/۲ سانتیمتر (BioRad، آمریکا) منتقل و از طریق شوک الکتریکی (۲/۰ کیلو ولت در میلی ثانیه) به سلولهای مستعد انتقال یافتند و در ادامه بلافاصله به آن محیط SOC مایع بدون آنتی بیوتیک اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شدند. باکتریهای رشد کرده با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به صورت چمنی کشت داده شدند.

گردید، سپس بلافاصله ۱ میلی لیتر از محیط LB مایع به مخلوط اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه همراه با همزن با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. باکتریهای رشد کرده با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد سپس از سویه‌های رشد کرده حاوی پلاسمید pKD46 به منظور انجام مراحل بعدی استفاده شد. لازم به ذکر است در مورد نمونه شاهد به جای DNA پلاسمیدی، از آب استریل فاقد آنزیم نوکلئاز استفاده گردید. به منظور ارزیابی کارایی تراریختی انجام شده، از دو مقدار پلاسمید تخلیص شده pKD46 به میزان ۱ و ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر با شرایط غلظت یکسان (۳۹ نانوگرم در میکرولیتر)، به یاخته مستعد الکتریکی اضافه و عمل تراریختی انجام و سپس به منظور کمی کردن نتایج، محاسبه کارایی بازده انتقال پلاسمید با استفاده از فرمول (۱-۱) انجام شد.

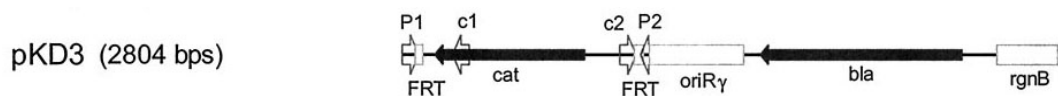
(شکل ۲). این ژنها تحت پروموتور القاپذیر با پروتئین Ara-C همسانه سازی گردیده اند. این حامل از پلاسمید pINT-t حاوی ژن *ara-C* و پروموتور آن به نام *ParaB* مشتق شده است، همچنین، در ساختن حامل فوق (Genbank AY048746) از پلاسمید pBAD18 و نیز DNA لامبدا استفاده گردیده است. این پلاسمید در مرکز (The Coli Genetic Stock Center) دانشگاه Yale آمریکا سنتز و برای اولین بار به کار گرفته شده است.

این پلاسمید از سویه *lacIq rrnBT14 BW25113* (*ΔlacZ*WJ16 *hsdR514 ΔaraBAAH33 ΔrhaBAA78*) به عنوان سویه والدی با استفاده از کیت (*AccuPrep* Plasmid Extraction Kit BioNEER) کره جنوبی) استخراج گردید. سپس سلول مستعد الکتریکی از شیگلا بومی بر اساس دستور العمل (مالوی، ۱۹۸۱) تهیه شد (۲۰). به این منظور ۴۰ میکرولیتر از یاخته مستعد الکتریکی با ۱ میکرولیتر از پلاسمید pKD46 در درون کووت مخلوط و سپس دستگاه الکتروپوریتور (BioRad USA) مطابق مرحله قبل تنظیم و عمل تراریختی انجام

$$\text{transformation efficiency} = \frac{\text{total \# of colonies on LB:AMP plate}}{\text{amount of DNA plated (in } \mu\text{g/mL)}}$$

فرمول ۱-۱

فرمول ۱- محاسبه کارایی تراریختی با استفاده از فرمول فوق انجام گردید. در این فرمول، نمایی # نشان‌دهنده تعداد کلونیهای رشد کرده در محیط آنتی بیوتیکی (آمپی سیلین) پس از تراریختی می باشد.



شکل ۳- این شکل بخشی از توالی DNA الگو به کار گرفته شده در تکثیر کاست کلرامفنیکل را نمایش می دهد. پیکان‌ها در واقع جایگاه و جهت گیری نقاط شروع کننده تکثیر کاست ژنی در پلاسمید pKD3 می باشد. P1: نقطه شروع کننده ۱، P2: نقطه شروع کننده ۲، C1، C2: نقطه شروع آغازگرهای عمومی به منظور تأیید صحت قرارگیری کاست کلرامفنیکل در جایگاه مورد انتظار در ژنوم میزبان می باشد (۸).

نوکلئوتیدی طراحی و انتخاب گردید. بیست و یک نوکلئوتید از جفت آغازگرهای طراحی شده با جایگاه شروع (P1 و P2) بر روی پلاسمید pKD3 (Genbank

طراحی آغازگر و تکثیر کاست کلرامفنیکل: به منظور تکثیر کاست حامل ژن کلرامفنیکل (*cat*) آغازگرهای forward و revers به ترتیب، با اندازه ۶۶ و ۶۵

ترازیختی و غربالگری: باکتری شیگلا حامل پلاسمید pKD46 در ۵۰ میلی لیتر از محیط SOB واجد آنتی بیوتیک آمپی سیلین (با غلظت نهایی ۱۰۰ میکرولیتر در میلی لیتر) و L-آرابینور (با غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار) مخلوط گردید و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرمادهی شد، پس از رسیدن تراکم سلولی به OD (چگالی نوری) ۰/۶ در فرکانس ۶۰۰ نانومتر، مطابق دستورالعمل مرحله قبل، یاخته مستعد الکتریکی تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن با ۱۰ میکرولیتر از کاست آنتی بیوتیکی کلرامفنیکل در کووت مخلوط و مطابق با مرحله قبل شوک الکتریکی انجام گردید. پس از شوک الکتریکی به میزان ۱ میلی لیتر از محیط LB مایع بدون آنتی بیوتیک به مخلوط اضافه و در گرمخانه به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد همراه همزن با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه گرمادهی گردید و سپس ۵۰ میکرولیتر از باکتری الکتروترانسفورم شده به محیط حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۱۲/۵ میکرولیتر در میلی لیتر) منتقل شد و به مدت ۳۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. غربالگری با واکنش PCR انجام شد. در مورد نمونه شاهد نیز مطابق مرحله قبل اجرا گردید (۸).

تأیید انجام نوترکیبی هومولوگ: به منظور تأیید انجام نوترکیبی آغازگرهای خارجی در محدوده ۳۰۰ نوکلئوتید در بالادست و پایین دست ژن *virG* بدون جایگاه برش آنزیمی و با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژنی طراحی و سنتز شد (سینا کلون، ایران). توالی آغازگرهای خارجی بالادست و پایین دست ژن *virG* عبارت بودند از:

EVRGF: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

EVRGR: 5' GCATTAGTTTCTGCAATACC 3'

واکنش PCR مطابق دستورالعمل ارائه شده جهت تکثیر ژن *virG* اجرا گردید با این تفاوت که از پرگنه باکتری به عنوان الگو و دمای اتصال آغازگرها ۵۹ درجه سانتی گراد انتخاب شد و سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱

یکسان (AY048742) (د/تسنکو و وانر، ۲۰۰۰) و مابقی نوکلئوتیدها با نواحی داخلی (۴۶ نوکلئوتید ابتدایی) ژن *virG* دارای همخوانی کامل بودند. این پلاسمید از سویه BW25993 (*lacIq hsdR514 ΔaraBADΔAH33 ΔrhaBADLD78*) مطابق مرحله قبل استخراج گردید (شکل ۳).

واکنش PCR به منظور تکثیر DNA در حجم ۱۰۰ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر از هر آغازگر (غلظت جفت آغازگرها ۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر (۴۰ میلی مولار) از مخلوط نوکلئوتیدهای dATP، dGTP، dCTP و dTTP، ۱ میکرولیتر از آنزیم DNA پلی مراز (High Fidelity PCR Mix، فرمتاز)، ۱۰ میکرولیتر از بافر 10x (MgCl₂ به همراه بافر بود)، ۱ میکرولیتر از DNA پلاسمیدی pKD3 (با غلظت ۸۹ میکروگرم در هر میلی لیتر) بود. چرخه های PCR شامل مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ دوره سه مرحله ای شامل واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه، طویل سازی قطعه مورد نظر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در پایان، مرحله طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد در مقایسه با مارکر مولکولی مورد تأیید قرار گرفت و سپس با استفاده از کیت (Gel Purification kit, QIAGEN, آمریکا) خالص سازی گردید. آغازگرهای طراحی شده به منظور تکثیر کاست آنتی بیوتیکی کلرامفنیکل عبارت بودند از:

VRGHF: 5' ATGAATCAAATTCACAAATTTTTTTT
GTAATATGACCCAATGTTTCAGTGTA

GGCTGGAGCTGCTTCG3'

VRGHR: 5' TCAGAAGGTATATTTTCACACCCAA
AATACCTGGGTGTCTCTGTTCATAT

GAATATCCTCCTTAGT 3'

۴۰۰(۶۲۲) محصول PCR ژن زیر واحد A شیگا توکسین در باکتری شماره ۳ (قطعه ۶۲۲ bp)، (۵) محصول PCR سویه شیگلا فلکسنری ۲b (ATCC ۱۲۰۲۲) به عنوان کنترل منفی.

نتایج

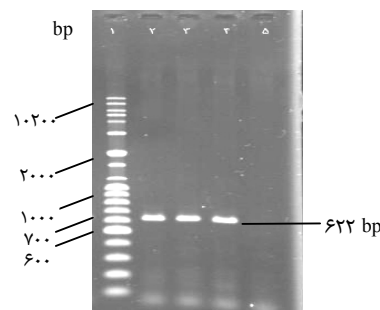
به منظور شناسایی و تعیین گونه و سرووار باکتریهای شیگلا از واکنشهای بیوشیمیایی، آنتی سرمی و PCR استفاده شد. نتایج واکنشهای بیوشیمیایی و آنتی سرمی حضور گونه شیگلا دیساتتری را در نمونه های دریافتی از بیمارستانهای میلاد و مفید تهران تأیید نمود. به منظور تعیین سرووار گونه های شیگلا، ژن زیر واحد A شیگا توکسین (مختص شیگلا دیساتتری تیپ ۱) با انجام روش PCR و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱ درصد تأیید گردید (شکل ۴، ستونهای ۲، ۳ و ۴).

در ابتدا به منظور اطمینان از صحت حضور کامل ژن *virG* در سویه بومی، اقدام به طراحی آغازگرهای اختصاصی (VRGR و VRGF) گردید. آغازگرها به گونه ای طراحی گردیدند که حداقل تمام طول ژن از طریق واکنش PCR تکثیر گردد. محصول واکنش PCR ژن *virG*، پس از الکتروفورز و رنگ آمیزی بر روی ژل آگاروز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که انتظار می رفت، قطعه ۳۳۷۹ جفت بازی بر روی ژل مشاهده گردید که از لحاظ اندازه با ژن هدف ما (*virG*) همخوانی کامل داشت (شکل نشان داده نشده است).

با توجه به اینکه روش recombineering یک روش قدرتمند، کارآ و در عین حال دقیق می باشد، بنابراین، در ابتدا نسبت به آگاهی دقیق از توالی ژن *virG* در سویه بومی اقدام شد، زیرا طراحی آغازگرهای حامل مناطق مشابه با ژن *virG* (VRGHR و VRGHF) که در این روش استفاده می شود با اطلاع کامل و دقیق از توالی ژن هدف امکان پذیر است. از این رو، همسانه سازی ژن *virG* در حامل pGEM-7zf انجام شد. در ابتدای این مرحله، جهت خطی نمودن حامل pGEM-7zf به منظور الحاق ژن *virG*

درصد الکتروفورز و صحت انجام نوترکیبی مورد تأیید قرار گرفت.

حذف کاست آنتی بیوتیکی کلرامفنیکل توسط پلاسمید pCP20: پلاسمید pCP20 (کریانوف و واکرناجل، ۱۹۹۵) مطابق مراحل قبل از سویه میزبان آن (BT340) استخراج و طبق روش مرحله قبل به سویه حامل کاست کلرامفنیکل (دارای توالیهای FRT در هر دو طرف) الکتروترانسفورم گردید. پلاسمید فوق دارای ژنهای آمپی سیلین و کلرامفنیکل به عنوان ژنهای گزارشگر (reporter gene) می باشد. به علاوه، این پلاسمید نیز مانند پلاسمید pKD46، دارای منشاء همانند سازی وابسته به دما (temperature sensitive) بوده به طوری که در این پلاسمید آنزیم FLP مخمیری تحت پروموتور λ_{PR} فاژ لامبدا قرار گرفته و تحت کنترل رپرسور λ_{CI857} می باشد. در این مرحله به منظور القای بیان پروتئین FLP در سویه شیگلا بومی جهش یافته ($\Delta virG$)، شوک گرمایی از ۳۰ به ۴۲ درجه سانتی گراد انجام گردید. سپس به منظور غربالگری و تأیید حذف کاست آنتی بیوتیکی کلرامفنیکل واکنش PCR با آغازگرهای خارجی انجام و محصول PCR توالی یابی شد (شرکت تکاپوزست، ایران). دستور PCR طبق روش انجام شده به منظور تکثیر ژن *virG* بود با این تفاوت که دمای اتصال آغازگرها ۵۳ درجه سانتی گراد انتخاب گردید (۸).



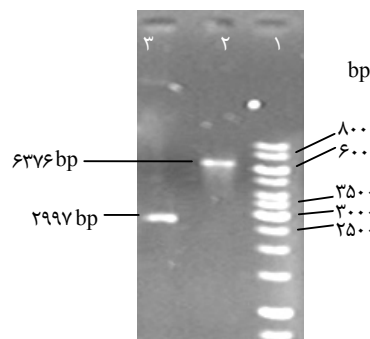
شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR تکثیر ژن زیر واحد A شیگا توکسین روی ژل آگاروز ۱٪ (۱) نشانگر وزن مولکولی DNA ۱۰۰۰ bp (کره جنوبی، BioNEER)، (۲) محصول PCR ژن زیر واحد A شیگا توکسین در باکتری شماره ۱ (قطعه ۶۲۲ bp)، (۳) محصول PCR ژن زیر واحد A شیگا توکسین در باکتری شماره ۲ (قطعه ۶۲۲ bp)

کلرامفینیکل) و pCP20 (مقاوم به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین و کلرامفینیکل) استفاده می‌گردد، بنابراین ضروری است حساسیت آنتی بیوتیکی سویه بومی مشخص گردد. در مرحله ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی، نتایج عدم مقاومت سویه بومی را نسبت به غلظت‌های انتخاب شده از آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین (با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و کلرامفینیکل (با غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر) در مقایسه با سویه شاهد (شیگلا دیسانتری مقاوم به آمپی سیلین و کلرامفینیکل، تهیه شده از بانک میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) که پیش‌تر حساسیت و یا عدم حساسیت آنها مورد تأیید قرار گرفته بود را نشان داد.

با توجه به اینکه حضور پلاسمید pKD46 با هدف افزایش فرکانس نوترکیبی در باکتری کاندید حذف ژنی، ضروری می‌باشد و از طرف دیگر این پلاسمید در خانواده پلاسمید های با تعداد رونوشت پایین (Low copy number) قرار می‌گیرد، بنابراین لازم است تا کارآیی انتقال این پلاسمید در شیگلا بومی مورد بررسی قرار گیرد، لذا با استفاده از فرمول ۱-۱ کارآیی ورود این پلاسمید با توجه به غلظت DNA پلاسمیدی بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج محاسبات حاصل از تراریختی پلاسمید pKD46 به باکتری شیگلا بومی، نشان داد که با افزایش مقدار پلاسمید از ۱ به ۱۰ میکرولیتر (در غلظت یکسان)، کارآیی تراریختی به میزان تقریباً ۱۰ برابر افزایش می‌کند. این نسبت در واقع نشان می‌دهد که با افزایش ۱۰ برابری مقدار پلاسمید، تعداد سویه های مقاوم بر روی محیط انتخابی (حاوی آمپی سیلین) نیز به همین میزان افزایش را از خود نشان می‌دهند.

پس از اطمینان از حضور پلاسمید pKD46 در سویه شیگلا بومی، با استفاده از آغازگر های طراحی شده (VRGHF و VRGHR) ویژه حذف ژن *virG*، واکنش تکثیر کاست کلرامفینیکل با واکنش PCR با استفاده از پلاسمید pKD3 به

از واکنش هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودکننده *SmaI* استفاده گردید، در اثر برش آنزیمی حامل pGEM-7zf قطعه ۲۹۹۷ جفت بازی با انتهای صاف (Blunt ends) به دست آمد (شکل ۵، ستون ۳). پس از الحاق ژن *virG* در حامل pGEM-7zf، اندازه قطعه مشاهده شده بر روی ژل آگاروز ۱ درصد مطابق انتظار بود (شکل ۵ ستون ۲، قطعه ۶۳۷۶bp). برای تأیید همسانه سازی، واکنش PCR انجام و محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل قطعه ۳۳۷۹ جفت بازی صحت همسانه سازی ساختار pGEM*virG* را نشان داد.



شکل ۵- الکتروفورز الحاق ژن *virG* و هضم آنزیمی حامل

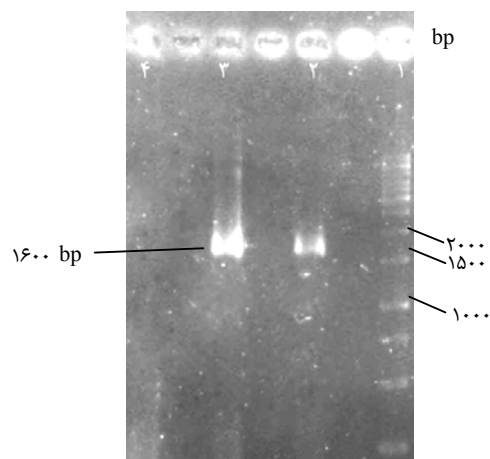
pGEM-7zf بر روی ژل آگاروز ۱ درصد (۱. نشانگر وزن

مولکولی DNA ۱Kb (آلمان، فرمتاز)، (۲) محصول واکنش الحاق ژن *virG* به حامل pGEM-7zf (۳) برش آنزیمی حامل pGEM-7zf با استفاده از آنزیم محدود کننده *SmaI*، قطعه ۲۲۹۷ bp نشان دهنده خطی شدن حامل پیش از انجام واکنش الحاق می‌باشد.

به منظور تأیید بیشتر همسانه pGEM*virG* توالی یابی ژن *virG* با آغازگر های عمومی M۱۳ حامل (pGEM-7zf) انجام گردید. نتایج تعیین توالی قطعه تکثیر یافته، هم خوانی کامل (۱۰۰ درصد) با توالی ژن *virG* استاندارد (شماره دسترسی CP000035) تهیه شده از پایگاه داده های ژنومی (NCBI) را نشان داد و صحت حضور کامل توالی ژن *virG* را در سویه تراریخت شده تأیید نمود.

با توجه به اینکه در تکنیک recombineering از پلاسمید های متعددی شامل pKD46 (مقاوم به آنتی بیوتیک آمپی سیلین)، pKD3 (حامل ژن مقاوم به آنتی بیوتیک

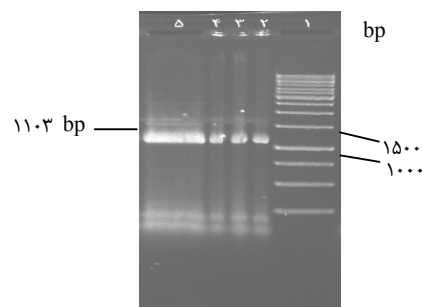
شدند که مناطق بالادست و پایین دست ژن هدف (*virG*) را تکثیر می‌نمایند. در صورت صحت وقوع رخداد نوترکیبی و حذف ژن *virG*، تکثیر قطعه DNA شامل مجموع نواحی بالادستی ژن *virG* (۲۵۰ جفت باز)، کاست کلامفینیکل (۱۱۰۳ جفت باز)، نواحی پایین دستی ژن *virG* (۲۴۷ جفت باز) می‌باشد، با اندازه برابر با ۱۶۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد. با توجه به محاسبات فوق، حضور قطعه ۱۶۰۰ جفت باز در شکل ۷ صحت وقوع نوترکیبی بین ژن *virG* با کاست آنتی بیوتیکی کلامفینیکل را تأیید نمود (ستونهای ۲ و ۳). در انتهای این مرحله با توجه به افزایش دما به بالاتر از ۳۰ درجه، پلاسمید pKD46 از سویه شیگلا بومی حذف گردید. کشت سویه تخیف حدت یافته $\Delta virG$ در محیط حاوی آمپی سیلین و عدم رشد بر روی این محیط صحت ادعای فوق را تأیید نمود (شکل نشان داده نشده است).



شکل ۷- الکتروفورز محصول PCR سویه جهش یافته شیگلا با استفاده از آغازگرهای خارجی. (۱) نشانگر وزن مولکولی DNA Kb (آلمان، فرمتاز)، ۲ و ۳) وجود قطعه ۱۶۰۰ جفت باز وقوع رخداد نوترکیبی در سویه شیگلا را تأیید می‌کند. (۴) نمونه کنترل منفی، از آب دیونیزه به عنوان DNA الگو، در واکنش PCR استفاده شده است.

در مرحله پایانی، با توجه به اینکه حضور ژن مقاوم آنتی بیوتیکی به عنوان یک عامل تهدید کننده در انتشار و گسترش ژنهای مقاوم مطرح می‌باشد بنابراین، در این مرحله نسبت به حذف این ژن با استفاده از پلاسمید

عنوان الگو صورت گرفت. پس از تکثیر کاست کلامفینیکل (ناحیه شروع کننده P1 + ۴۶ نوکلئوتید آغازی ژن *virG* + توالی FRT + ژن مقاوم به کلامفینیکل (*cat*) + توالی FRT + ناحیه شروع کننده P2 + ۴۵ نوکلئوتید انتهایی ژن *virG*) (شکل ۶) و انتقال آن به سویه شیگلا بومی حامل پلاسمید pKD46، عمل غربالگری بر روی محیط حاوی کلامفینیکل (غلظت ۱۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر) انجام گردید.



شکل ۶- الکتروفورز محصول PCR کاست کلامفینیکل. (۱) نشانگر وزن مولکولی DNA Kb (آلمان، فرمتاز)، ۲ الی ۵) تشکیل قطعه ۱۱۰۳ جفت باز، تکثیر کاست آنتی بیوتیکی کلامفینیکل را با استفاده از پلاسمید pKD3 را نشان می‌دهد.

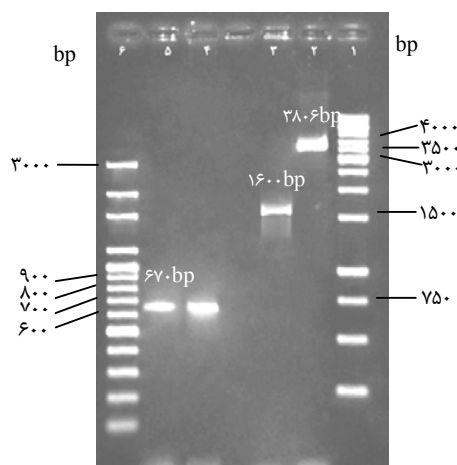
پس از انجام تراریختی کاست کلامفینیکل در سویه حامل pKD46 و نیز القای بیرونی این پلاسمید توسط قند ال-آرابینوز (L-Arabinose) انتظار می‌رود که پدیده نوترکیبی بین ژن *virG* و کاست کلامفینیکل صورت گیرد. رشد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک کلامفینیکل در فاز ابتدایی، صحت قرار گیری کاست کلامفینیکل در ژنوم شیگلا را به صورت فنوتیپی تأیید می‌نماید. اما با توجه به اینکه در تکنیک *recombineering* از مناطق با هومولوژی پایین (بین ۳۰ تا ۵۰ نوکلئوتید) استفاده می‌گردد، بنابراین احتمال قرار گیری نا به جا (غیر از جایگاه مورد انتظار) کاست کلامفینیکل وجود دارد. لذا به منظور اطمینان از صحت انجام نوترکیبی صحیح، واکنش PCR با استفاده از آغازگر های خارجی (External) نسبت به کاست کلامفینیکل انجام گردید. این آغازگرها به گونه ای طراحی

2.33) مورد بازخوانی قرار گرفت. نتایج حاصل از بازخوانی ناحیه توالی یابی شده و مقایسه آن با ژن *virG* پیش از وقوع رخداد جهش نشان داد که تعداد ۳۲۲۰ جفت باز از ژن *virG* در سویه بیمارستانی شیگلا دیسانتری تیپ ۱ حذف گردیده است.

بحث

تا کنون تلاش‌های بسیار زیادی جهت تولید یک واکسن ایمن و مؤثر بر علیه عامل بیماری اسهال خونی در جهان صورت گرفته است. ولی هیچ کدام از آنها به دلایلی مانند: ایمن نبودن در کودکان، عدم تحریک مناسب ایمنی مخاطی، پیچیده بودن روند تولید واکسن و گران بودن معجز استفاده در حجم وسیع و عمومی را دریافت نکرده اند و گاهی مصرف آنها به یک کشور خاص و در گروه سنی خاصی محدود شده است. یکی از مهم ترین راهکارهای تولید واکسن علیه شیگلوز تولید واکسنهای زنده مهاجم و تخفیف حدت یافته می باشد زیرا این واکسنها علاوه بر داشتن مصرف خوراکی، توانایی بالایی را در تحریک سیستم ایمنی مخاطی و فعال کردن شدید سیستم ایمنی دارا هستند (۹ و ۱۴). میترا و همکاران در سال ۱۹۸۴ سویه جهش یافته T32-ISTRATI را با استفاده از تکنیک پاساژ متوالی در شیگلا فلکسنری 2a ایجاد نمودند. این کاندید واکسنی پس از ۳۲ مرتبه کشت متوالی در محیط نوترینت آگار جداسازی و از نظر ایجاد ورم ملتحمه در چشم خوکچه هندی (تست Sereny) منفی گزارش گردید (۲۱). ونکاتسن و همکاران در سال ۱۹۹۰ سویه کاندید واکسنی T32-ISTRATI را از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی ارزیابی نمودند. ارزیابی‌ها حذف سه لکوس *virG*، *invA* و *IpaABCD* رادر پلاسمید تهاجمی شیگلا نشان داد. همچنین کاندید واکسنی شیگلا فلکسنری 2a وابسته به استرپتومایسین (SmD) نیز با روشی مشابه که در ساخت T32-ISTRATI به کار رفت، در سال ۱۹۷۲ ایجاد شد. تکنیک پاساژ متوالی معایبی همچون عدم اختصاصیت،

pCP20 اقدام گردید. انجام شوک گرمایی (دمای بالاتر از ۴۰ درجه سانتی گراد) سبب می شود تا رپرسور λ cI857 از فرم طبیعی خود خارج گردد و باعث بیان آنزیم FLP ریکامیناز در سویه شیگلای حامل جهش در ژن *virG* ($\Delta virG::cat$) گردد. این آنزیم سبب حذف کاست کلرامفنیکل از طریق نوترکیبی بین توالیهای FRT می گردد. همان طور که در شکل ۸ مشاهده می شود، قطعه ۶۷۰ جفت بازی نمایانگر حذف کاست کلرامفنیکل در شیگلا حامل جهش در ژن *virG* ($\Delta virG$) از طریق انجام نوترکیبی بین توالیهای FRT می باشد (ستونهای ۴، ۵) به علاوه، محصول PCR سویه وحشی شیگلا، قبل و پس از انجام نوترکیبی با استفاده از آغازگرهای خارجی ژن *virG* به ترتیب در ستونهای ۲ و ۳ نشان داده شده است (شکل ۸).



شکل ۸- الکتروفورز محصول PCR سویه شیگلا دیسانتری بومی با استفاده از آغازگرهای خارجی. (۱) نشانگر وزن مولکولی DNA Kb (آلمان، فرمتناز)، (۲) محصول PCR تشخیص ژن *virG*، قبل از ایجاد جهش در باکتری شیگلا (۳۸۰۶ bp)، (۳) محصول PCR ژن *virG* پس از انجام نوترکیبی ۴ و ۵) محصول PCR پس از حذف کاست آنتی بیوتیکی کلرامفنیکل توسط پروتئین FLP حاصل از پلاسمید pCP20 (قطعه ۶۷۰ bp)، (۶) نشانگر با وزن مولکولی ۱۰۰۰ DNA (آلمان، فرمتناز).

به منظور تأیید بیشتر حذف ژن *virG* در سویه بومی، محصول PCR حاصل از مرحله آخر (قطعه ۶۷۰ جفت بازی)، تعیین توالی و با نرم افزار (Chromas version

برگشت پذیری به نوع وحشی و ناپایداری ژنتیکی را دارد، بنابراین به منظور ایجاد جهش اختصاصی و هدفمند در باکتری مناسب نمی باشد (۱۹، ۲۷ و ۳۳).

امروزه با پیشرفت روشهای مهندسی ژنتیک تکنیکهای مختلفی به منظور ایجاد جهش و گسستگی در ژنها استفاده می گردد که بیشترین آنها بر پایه غیر فعال کردن ژنها از طریق دخول کاست ژنی و یا حذف ژن قرار گرفته است (۲ و ۱۱). یکی از مهم ترین روشها، استفاده از پلاسمیدهای انتحاری می باشد. یوشیکاوا و همکاران در سال ۱۹۹۵ با ایجاد دو جهش در ژنهای *virG* و *thyA* توانستند سویه تخفیف حدت یافته شیگلا فلکسنری 2a را با استفاده از ترانسپوزون *Tn10* و فاژ PI ایجاد کنند. عدم ایجاد التهاب و حفاظت در برابر شیگلا از نتایج آن در مدل حیوانی خوکیچه هندی بود (۳۶).

سویه کانیدید واکسنی CVD1203 ($\Delta virG$, $\Delta aroA$) توسط نورجیا و همکاران در سال ۱۹۹۴ با استفاده از پلاسمید های انتحاری pFJ201، pKTN701 ساخته شد (۲۴). نتایج بالینی این سویه واکسنی در خوکیچه هندی و انسان در دژ متوسط (در حدود 10^6 CFU) نشان از تحمل پذیری بالای آن داشت اما در دژ های بالاتر (در حدود 10^8 - 10^9 CFU) بخشی از دریافت کنندگان به سویه واکسنی واکنش منفی نشان دادند (۱۵، ۲۴). بنابراین ایجاد تخفیف حدت بیشتر از طریق غیر فعال نمودن مسیر های بیوسنتزی، متابولیکی و نیز توکسینی مورد توجه قرار گرفت. همچنین علاوه بر CVD1203 ($\Delta virG$, $\Delta aroA$)، CVD1204 ($\Delta guaBA$)، CVD1205 ($\Delta virG$, $\Delta guaBA$) و CVD1207 (Δset , Δsen , $\Delta guaBA$, $\Delta virG$) و CVD1208 (Δsen , $\Delta guaBA$, Δset)، بر پایه استفاده از پلاسمید های انتحاری و پدیده تبادل آلی طراحی و ساخته شد. نتایج بالینی سویه های تولید شده نشان دادند که حذف و غیر فعال نمودن این ژنها تحمل پذیری و ایمنی زایی بالایی را در انسان سبب می گردد (۱۲، ۱۴، ۱۵).

و ۲۶). ونکاتسن و همکاران در سال ۲۰۰۲ با ایجاد جهش در دو ژن *virG* و *stxA* سویه کانیدید واکسنی WRSd1 را ایجاد نمودند. در این تحقیق از پلاسمید انتحاری pCVD442 و محیط حاوی کلرات پتاسیم به منظور حذف ژنهای *virG* و *stx* استفاده گردید (۳۴). ساورژر و همکاران در سال ۲۰۰۸ سویه کانیدید واکسنی SC599، را از سویه شیگلا دیسانتری تیپ ۱ حامل جهش حذفی در ژنهای *virG*، *entF* (ژن مسئول بیوسنتز انتروکلین)، *fepA* (گیرنده دریافت کننده انتروکلین) و *fes* (مسئول رها سازی Fe^{3+} از انتروکلین) ساختند. در این تحقیق از پلاسمید انتحاری pJM703/1 و کاست بیانی *npt1-sacB-sacR* استفاده شد. نتایج بالینی این سویه در داوطلبان انسانی ایمنی محافظتی مناسبی را از خود نشان داد (۲۶). به کارگیری پلاسمید های انتحاری به منظور حذف ژن در باکتریها معایبی را دارا می باشند که از آن جمله می توان به مواردی مانند استفاده از پلاسمید های متعدد، هزینه بالا و زمان زیاد، تکثیر قطعات مشابه با طول بالا و نیز احتمال از بین رفتن پلاسمید انتحاری در میزبان مورد نظر اشاره کرد.

تکنیکی که در تحقیق حاضر از آن استفاده گردید تکنیک حذف ژن با استفاده از سیستم نوترکیبی فاژی یا recombineering بود. مزایای این روش نسبت به سایر روشها شامل سادگی روش، هزینه پایین، افزایش فرکانس نوترکیبی، انتخاب مناطق مشابه (هومولوژی) کوتاه تر و مهم تر از دیگر موارد، زمان کمتر می باشد. این تکنیک برای اولین بار توسط داتسنکو و وانر در سال ۲۰۰۰ ابداع گردید اما سپس در سویه های دیگری شامل سالمونلا، یرسینیا و سریشیا گسترش پیدا نمود (۲۲ و ۲۷). نتایج به کارگیری این روش در دیگر سویه ها نشان داد که یکی از فاکتور های تأثیر گذار در کاربرد این تکنیک در میزبانهای متفاوت می تواند به اثر تخریبی بیان فاژ های لامبدا در آنها برگردد. همچنین در این تحقیقات نشان داده شد که افزایش طول کاست آنتی بیوتیکی میزان فرکانس نوترکیبی

طور مثال با افزایش طول ناحیه هومولوگ از ۵۰ به ۱۰۰۰ نوکلئوتید تعداد سویه‌های جهش یافته به نسبت تقریبی ۳/۲ برابر افزایش را نشان دادند (۳۵).

یکی از مشکلات تکنیک *recombineering*، غربالگری سویه جهش یافته پس از حذف کاست آنتی بیوتیکی با واسطه آنزیم FLP بود، به طوری که به منظور شناسایی سویه جهش یافته صحیح بین ۱۰ تا ۲۰ سویه مورد ارزیابی و آنالیز با واکنش PCR قرار گرفت. یکی از دلایل کاهش کارایی نوترکیبی احتمالاً می‌تواند به حذف یا اختلال در جایگاه‌های FRT قرار گرفته در دو طرف کاست آنتی بیوتیکی، مربوط شود. قرار گیری غیر اختصاصی جایگاه‌های FRT در ژنوم شیگلا امکان نوترکیبی اشتباه را افزایش می‌دهد. در نظر است تا در مطالعات بعدی به مطالعه و ارزیابی قدرت تهاجم آن در سلول‌های هلا، تجویز خوراکی در حیوان آزمایشگاهی، سنجش پتانسیل در ایجاد ایمنی محافظتی و نیز به عنوان سویه والد در تولید کاندید واکسنی با چندین جهش حذفی اقدام گردد.

نتیجه گیری

سیستم نوترکیبی Red روشی سریع، ارزان، ساده و قدرتمند می‌باشد که در مقایسه با روش‌های پیشین که دارای مهندسی‌های گسترده و در عین حال وقت گیر بودند بسیار کارآ و مقرون به صرفه تر می‌باشند. این تکنیک با توجه به کارایی بالای آن قادر است در شناسایی ژن‌های ناشناخته باکتری با عملکرد نامعلوم، شناسایی فاکتورهای مستعد بیماری‌زایی باکتریایی و نیز در تولید واکسن‌های خوراکی دارای چندین جهش به کار گرفته شود.

تشکر و قدردانی: در پایان از مهندس غفاری، اشرافی، خرمالی در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و مهندس زند در دانشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین (ع) و از کارکنان مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)

را افزایش می‌دهد (۷-۸، ۲۳، ۳۷). در سال ۲۰۰۶ توسط *زنلوو همکاران* سویه‌های جهش یافته ای در ژن‌های *virG*، *stxAB* و *virG* (WRSf2) 2a، ژن‌های *stxAB* و *virG* در شیگلا فلکسنری 2a (WRSf2)، ژن‌های *stxAB* و *virG* در شیگلا دیسائتری تیپ ۱ (WRSd1) و ژن‌های *sen virG* و *ipaB* در شیگلا سونه ای (WRSs) ایجاد گردیدند. تکنیک به کار گرفته شده به منظور ایجاد این سویه‌ها روش *recombineering* بود. نتایج این تحقیق کارایی این تکنیک را در باکتری شیگلا نشان داد (۲۵).

با توجه به نتایج بالینی سویه‌های واکسنی تولید شده به نظر می‌رسد ژن *virG* یک انتخاب مهم باشد چرا که حذف این ژن تهاجم به سلول‌های هلا را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد اما گسترش بین سلولی باکتری شیگلا را به شدت کاهش می‌دهد. در تحقیق حاضر با توجه به نقش اساسی ژن *virG* در آلودگی بدن میزبان به عنوان اولین ژن هدف در تولید سویه کاندید واکسنی شیگلا دیسائتری تیپ ۱ انتخاب گردید. در این مطالعه از پلاسمید pKD46 و دستورالعمل د/تسنکو و وانر در سال ۲۰۰۰ به منظور تراریختی استفاده گردید. پلاسمید pKD46 پلاسمیدی با توانایی تکثیر پایین می‌باشد که توانایی تنظیم بیان دقیق ژن‌های لامبدا (*Exo*, *Beta*, *Gam*) را می‌دهد که در مقایسه با پلاسمید pKM208 به کار گرفته شده توسط *رانلو و همکاران* اندازه کوچکتری (۶/۴Kb) دارد و نیز القا پذیری آن از طریق L-آرابینوز می‌باشد. در این تحقیق آغازگرهای با طول به ترتیب ۶۶ و ۶۵ جفت بازی (منطقه هومولوگ با ژن *virG* به ترتیب شامل ۴۶ و ۴۵ جفت باز) طراحی و استفاده شد. *یاماموتو و همکاران* در سال ۲۰۰۹ توانستند با بهره‌گیری از این تکنیک در ژنوم *ویبریولکرا* ایجاد تغییر نمایند. در این مطالعه طول مناطق هومولوگ استفاده شده به ترتیب از ۵۰، ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نوکلئوتید انتخاب شد. نتایج مطالعه *یاماموتو و همکاران* نشان داد که با افزایش طول منطقه هومولوگ با ژن هدف، فرکانس نوترکیبی نیز به طور چشمگیری افزایش پیدا می‌کند، به

که در انجام این تحقیق کمک و یاری نموده اند کمال

تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

- 1- Alexander, W. A. Hartman, A. B. Oaks, E.V. Venkatesan, M. M. (1996). Construction and characterization of virG (icsA)-deleted E.coli K12- S.flexnerri hybrid vaccine strains. *Vaccine*. 14:1053-1061.
- 2- Aleyasin, A. Tahmasebi-Mirgani, M. (2008). Investigation of 844ins67 polymorphism of cystathionine beta synthase in folic acid pathway as a maternal risk factor of Down Syndrom among Iranian mothers. *IBJ*. 21:877-890.
- 3- Banish, L. D. Sims, R. Sack, D. Montali, R. J. Phillips, L. Bush, M. (1993). Prevalence of shigellosis and other enteric pathogens in a zoologic collection of primates. *J Am Vet Med Assoc*. 203:126-132.
- 4- Bennis, M.L. (1991). Potentially lethal complications of shigellosis. *Rev Infect Dis*. 13: 319-324.
- 5- Bernardini, M. L. Mounier, J. d'Hauteville, H. Coquis-Randon, M. Sansonetti, P. J. (1989). Identification of icsA, a plasmid locus of Shigella flexneri that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:3867-3871.
- 6- Chaveroche, M. K. Ghigo, J. M. and d'Enfert C. (2000). A rapid method for efficient gene replacement in the Filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res*. 28: 97.
- 7- Court, D. L. Sawitzke J. A. Thomason L. C. (2002). Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet*. 36:361-388.
- 8- Datsenko, K. A. Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:6640-6645.
- 9- Fries, L. F. Montemarano, A. D. Mallet, C. P. Taylor, D. N. Hale, T. L. and Lowell, G. H. (2001). Safety and immunogenicity of a proteosome-Shigella flexneri 2a lipopolysaccharide vaccine administered intranasally to healthy adults. *Infect. Immun*. 69: 4545-4553.
- 10- Girard, M. P. Steele, D. Chaignat, C. L. Kieny, M. P. (2006). A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine*. 24:2732-2750.
- 11- Haddad Mashadizadeh, A.A. Zomorodipour, A. Hosseini, S. J. Sabouni. F. (2008). In silico investigation and synchronous application of introns 1 and 2 of human beta-globin to increase the expression of human coagulation Factor IX. *IBJ*. 21:918-930.
- 12- Hartman, A. B. Venkatesan, M. M. (1998). Construction of a stable attenuated shigella sonnei Δ virG vaccine strain, WRSS1, and protective efficacy and immunogenicity in the guinea pig keratoconjunctivitis model. *Infect Immun*. 66:4572-4576.
- 13- <http://www.clcbio.com>
- 14- Jennison, A.V. Verma, N. K. (2004). Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol Rev*. 28:43-58.
- 15- Kotloff, K. L. Pasetti, M. F. Barry, E. M. Nataro, J. P. Wasserman, S. S. Sztein, M. B. and et al. (2004). Deletion in the Shigella enterotoxin genes further attenuates Shigella flexneri 2a bearing guanine auxotrophy in a phase I trial of CVD 1204 and CVD 1208. *J Infect Dis*. 190:1745-1754.
- 16- Kotloff, K. L. Winickoff, J. P. Ivanoff, B. Clemens, J. D. Swerdlow, D. L. Sansonetti, P. J. and et al. (1999). Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. World Health Organ*. 77: 651-666.
- 17- Lan R. Alles, M. C. Donohoe, K. Martinez, M. B. Reeves, P. R. (2004). Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and shigella spp. *Infect Immun*. 72:5080-5088.
- 18- Lesic, B. Rahme, L. G. (2008). Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Mol Biol*. 9:20.
- 19- Lett, M.C. Sasakawa, C. Okada, N. Sakai, T. (1989). virG, a plasmid-coded virulence gene of Shigella flexneri: identification of the VirG protein and determination of the complete coding sequence. *J Bacteriol*. 171:353-359.
- 20- Maloy, S.R. and Nunn, W.D. 1981. Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 145:1110-1111.
- 21- Meitert, T. Penu, E. Ciudin, L. and Tonciu, M. (1984). Vaccine strain Sh. flexneri T32-ISTRATI. Studies in animals and volunteers. Antidysentery immunoprophylaxis and immunotherapy by live vaccine VADIZEN (Sh. flexneri T32-ISTRATI). *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol*. 43, 251-278.
- 22- Moreno, R. S. Acosta, S. Hernalsteens, J. P. and et al. (2006). Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC Molecular Biology*. 7:1-12.

- 23- Murphy, K. C. (1998). Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacterio*. 180:2063-2071.
- 24- Noriega, F. R. Wang, J. Y. Losonsky, G. Maneval, D. R. Hone, D. M. and Levin, M. M. (1994). Construction and Characterization of Attenuated AaroA AvirG *Shigella flexneri* 2a Strain CVD 1203, a Prototype Live Oral Vaccine. *Infect. Immun*. 62:5168-5172.
- 25- Ranallo, R. T. Barnoy, S. Thakkar, S. Urick, T. Venkatesan, M. M. (2006). Developing live *Shigella* vaccines using lambda red recombineering. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 47:462-469.
- 26- Sadorge, Ch. Ndiaye, A. Beveridge, N. Frazer, S. Giemza, R. Jolly, N. and et al. (2008). Phase 1 clinical trial of live attenuated *Shigella dysenteriae* type-1 Δ icsA Δ ent Δ fep Δ stxA:HgR oral vaccine SC599 in healthy human adult volunteers. *Vaccine*. 26: 978—987.
- 27- Serra-Moreno, R. Acosta, S. Hernalsteens, J. P. Jofre, J. and Muniesa, M. (2006). Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC Mol Biol*. 31:1-12.
- 28- Suzuki, T. Sasakawa, C. (2001). Molecular basis of intracellular spreading of *Shigella*. *Infect Immun*. 69:5959-5966.
- 29- Talukder, K. A. Dutta, D.K. Safa A, Ansaruzzaman M, Hassan, H. Alam, K. Islam, K. M. N. Carlin, N. I. A. Nair, G. B and Sack, D. A. (2001). Altering trends in the dominance of *Shigella flexneri* serotypes and emergence of serologically atypical *S. flexneri* strains in Dhaka, Bangladesh. *J. Clin. Microbiol*. 39:3757-3759.
- 30- Toshihiko, S. Shinsuke, S. and Chihiro, S. (1996). Functional Analysis of *Shigella* VirG Domains Essential for Interaction with Vinculin and Actin-based Motility. *J Bio Chem*. 271:21878-21885.
- 31- Venkatesan MM, Goldberg MB. Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. *Infect Immun*. 2001;69:3271-3285.
- 32- Venkatesan, M. M. Buysse, J. M. Kopecko, D. J. (1988). Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from *Shigella flexneri*. *Proc Natl Acad USA*. 85:9317-9321.
- 33- Venkatesan, M. M. Fernandez-Prada, C. Buysse, J. M. Formal, S. B. and Hale, T. L. (1991). Virulence phenotype and genetic characteristics of the T32-ISTRATI *Shigella flexneri* 2a vaccine strain. *Vaccine*. 9: 358-363.
- 34- Venkatesan, M. M. Hartman, A. B. Newland, J. W. Ivanova, V. S. Hale, T. L. McDonough, M. and et al. (2002). Construction, Characterization, and animal Testing of WRSd1, a *Shigella Dysenteriae* 1 Vaccine. *Infect Immun*. 70:2950-2958.
- 35- Yamamoto, Sh. Izumiya, H. Morita, M. Arakawa, E. Watanabe, H. (2009). Application of λ Red recombination system to *Vibrio cholerae* genetics: Simple methods for inactivation and modification of chromosomal genes. *Gene*. 438:57-64.
- 36- Yoshikawa, M. Sasakawa, Ch. Okada, N. Takasaka, M. Nakayama, M. Yoshikawat, Y. and et al. (1995). Construction and evaluation of a virG thyA double mutant of *Shigella flexneri* 2a as a candidate live attenuated oral vaccine. *Vaccine*. 13: 1436-1440.
- 37- Zhang, Y. Buchholz, F. Muyrers, J. P. Stewart, A. F. (1998). A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *NatGenet*. 20:123-128.

Identification, cloning, sequencing *virG* gene and construction a live Attenuated $\Delta virG(icsA)$ strain by using λ Red recombinase

Hosseini S.M.^{1,5}, Saadati M.², Nayeri Fasaei B.³, Zahraei Salehi T.³, Ahmadydaneh H.⁴, Tat M.² and Hosseini E.⁶

1- Human Genetic Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of Iran

2- Biology Dept., Imam Hossein University, Tehran, I.R. of Iran

3- Microbiology Dept., Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

4- Industry & Environment Dept., National Institute Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran

5- Young Researchers Club, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

6- Young Researchers Club, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) strains belong to the gram negative bacterium family which cause the most communicable of bacterial dysenteries (shigellosis). The *virG* gene as an essential factor is required for pathogenicity of shigella. This protein encoded via *virG* gene which located on the outer membrane (OM) of bacteria surface. Furthermore, the VirG protein belonging to autotransporter (AT) protein family of extracellular protein's gram-negative bacteria. This protein interacts with the host actin regulatory protein which caused intra- and intercellular spreading throughout the host epithelium. One approach for construction of *Shigella* vaccines is to attenuate wild-type strains by mutating genes which regulate specific virulence properties. The aim of this research was identification, cloning, sequencing *virG* gene and construction of a live attenuated $\Delta virG$ by use of the λ Red recombinase in *Shigella dysenteriae* type 1 isolated from patients with shigellosis. By use of serological and Polymerase Chain Reaction (PCR) tests, species and serotype of *shigella* separated from patient was confirmed. According to the Gene Bank database (NCBI), detection primers of *virG* gene was designed, after amplification of *virG*, this construct was cloned to pGEM-7zf vector as cloning vector. Finally, sequencing was performed by use of universal primers of vector. The pKD46 as helper plasmid (composed of the essential genes for induce recombination under arabinose promoter) was transformed to the native shigella by using electroporation. After designing the primers which require for induction recombination, the PCR reaction performed through pKD3 vector (which compose of chloramphenicol cassette flanked by FRT sequence). After purification of chloramphenicol cassette, this cassette transformed to the native shigella which carrying pKD46 by using electronic shock. Mutant strain obtained by occurring homologous recombination between chloramphenicol cassette and *virG* gene. Then, antibiotic cassette was eliminated via FRT sites by application of pCP20 (carrying FLP recombinase) as helper plasmid. Precision of process was confirmed by phenotypic (growth resistant strain to chloramphenicol) and genotypic (PCR reaction with external primers and then sequencing of its product) characterization. The result sequencing of *virG* in comparison with standard strain as reference strain (Accession No. CP000035) was identical (100%). According to bioinformatics analysis mutant strain, deletion of 3220 bp of *virG* gene was confirmed. Utilization of λ Red recombinase system facilitates mutant construction in more cost-effective method in comparison with the other techniques such as suicide vector.

Keywords: Shigellosis, *Shigella dysenteriae* type 1, *virG* (*icsA*), λ Red recombinase, homologous recombination.