

کلونینگ و بیان ژن کدکننده پروتئین CsU از باکتری *اسیتوباکتر بومانی* مقاوم به کارباپنم به منظور ایجاد واکسن ژنی نو ترکیب

اسکندر حسین نژاد لزرجانی^۱، عباس دوستی^{۲*} و علی شریف زاده^۳

^۱ ایران، شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی.

^۲ ایران، شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی.

^۳ ایران، شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۱۱

چکیده

اسیتوباکتر بومانی، کوکوباسیل گرم منفی غیرتخمیری است که مقاومت بالایی به ترکیبات ضد میکروبی نشان می‌دهد. تشکیل بیوفیلم یکی از ویژگی‌های مهم بسیاری از گونه‌های *اسیتوباکتر* است که منجر به مقاومت بالا به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. مطالعه حاضر با هدف گیری پروتئین چاپرون بیوژن فیمبريال CsU از باکتری *اسیتوباکتر بومانی* مقاوم به کارباپنم جهت ساخت سازواره ژنی انجام شد. در این مطالعه تجربی، ژن کدکننده ی پروتئین چاپرون بیوژن فیمبريال CsU از باکتری *اسیتوباکتر بومانی* مقاوم به کارباپنم به روش PCR تکثیر شد. سپس، سازواره هدف توسط برنامه آنالاین *PlasMapper* طراحی شد. ژن مذکور به ترتیب در ناقل‌های T و pcDNA3.1 همسانه سازی و زیر همسانه سازی گردید. تایید صحت کلونینگ ژن با سه روش PCR، آنزیم‌های برش دهنده و تعیین توالی مورد ارزیابی قرار گرفت. خلص سازی پلاسمید با کیت استخراج پلاسمید LPS-Free انجام شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت 100ng/ml از ناقل نو ترکیب نهایی pcDNA3.1-csuC به عضله ۴ سران موش BALB/c تزریق گردید و بیان ژن هدف در عضله ۴ سران موش با روش RT-PCR بررسی شد. سپس اثر زمان بر تغییرات بیان ژن در روزهای ۲، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ پس از تزریق توسط آزمون کمی real time-PCR بررسی شد و نتایج اختلاف بیان در سطوح معناداری $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$ گزارش شد. قطعه ۸۳۱ جفت بازی مربوط به ژن *csuC* *اسیتوباکتر بومانی* با موفقیت تکثیر شد. همچنین، نتایج تحقیق نشان داد که سازواره نهایی pcDNA3.1-csuC تشکیل گردیده است. مشاهده باند ۸۳۱ جفت بازی پس از انجام RT-PCR، در عضله ۴ سران موش در گروه pcDNA3.1-csuC نسبت به گروه شاهد (PBS)، مویید بیان ژن *csuC* در عضله ۴ سران موش می‌باشد. نتایج بررسی تغییرات بیان ژن در گروه هدف نسبت به گروه کنترل نشان داد که در گروه هدف میزان بیان ژن هدف پس از ۲ روز افزایش بیان قابل توجهی را نشان داد. این افزایش بیان تا روز ۳۰ پس از تزریق به بالاترین سطح خود رسید و اختلاف بیان در سطح $P < 0.001$ معنادار بود. افزایش بیان ژن ۴۰ روز پس از تزریق به سطح معناداری $P < 0.01$ کاهش یافت. این کاهش میزان بیان تا روز ۶۰ پس از تزریق ادامه داشت ($P < 0.001$). سازواره نو ترکیب pcDNA3.1-csuC ساخته شده در این تحقیق توان بیان ژن *csuC/اسیتوباکتر بومانی* را در عضله ۴ سران موش دارد. بیان موفق ژن هدف می‌تواند در راستای بررسی ایمنی زایی در حیوانات آزمایشگاهی به عنوان یک واکسن نو ترکیب مدنظر قرار گیرد. همچنین، سازواره pcDNA3.1-csuC از پتانسیل لازم برای بررسی به عنوان واکسن ژنی در تحقیقات آینده برخوردار است.

واژه های کلیدی: *اسیتوباکتر بومانی*، *csuC*، سازواره نو ترکیب pcDNA3.1-csuC، RT-PCR

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۱۹، پست الکترونیکی: abbasdoosti@yahoo.com

مقدمه

عفونت‌های بیمارستانی یک مشکل جدی مراکز بهداشتی درمانی می‌باشند و هرساله هزینه‌های زیادی را به بیماران و مراکز بهداشتی درمانی تحمیل می‌کنند (۱). امروزه کنترل عفونت‌های بیمارستانی به دلیل رشد روزافزون جمعیت و

استیل ترانسفرازها که باعث مقاومت به آمینو گلیکوزیدها می‌شود. علاوه بر موارد ذکر شده مکانیسم دیگری در مقاومت آنتی بیوتیکی /اسیتوباکتر بومانی تحت عنوان بیوفیلیم وجود دارد (۱۵،۲۸). بیوفیلیم، در حال حاضر به عنوان یکی از ترکیبات مهم مقاومت باکتری‌ها به اکثر گروه‌های آنتی‌بیوتیکی شناخته شده است (۱۶). بیوفیلیم‌ها تجمع پیچیده‌ای از کلنی‌های میکروبی می‌باشند که منجر به تشکیل یک شبکه سلولی می‌شوند که از یک لایه محافظ پلی ساکاریدی تشکیل شده است (۷-۱۰، ۱۷). سلول چسبنده در بیوفیلیم درون یک ماتریکس خارج سلولی قرار دارد که حاوی مواد پلیمری خارج سلولی (EPS) است. سلول‌های میکروبی اجزای اصلی بیوفیلیم‌ها هستند که EPS تولید می‌کنند که شامل 50 تا 90 درصد کل کربن آلی موجود در بیوفیلیم‌ها است (۶، ۱۸). لذا تشکیل بیوفیلیم عامل اصلی در بقا و مقاومت باکتریایی است (۱۰، ۱۹). تشکیل بیوفیلیم /اسیتوباکتر بومانی در سطوح غیر زنده به طور عمده توسط پیل (مژه) حاوی پروتئین Csu انجام می‌شود. این مجموعه از ۴ زیرواحد تشکیل شده است که ساختار کریستالی B /CsuC-CsuA به عنوان چارون پیش ساز این مجموعه می‌باشد و از اهمیت بالایی در تشکیل این ساختار برخوردار است. لذا ایجاد اختلال در یکی از این اجزا باعث اختلال در تشکیل مجموعه CsuC-CsuA/B شده، که متعاقباً از تشکیل بیوفیلیم جلوگیری می‌کند (۱۱، ۲۰). CsuC یک پروتئین در سطح خارجی /اسیتوباکتر بومانی می‌باشد که شامل هسته مرکزی در ارتباط با انواع پروتئین‌های دخیل در مقاومت می‌باشد. این پروتئین به باکتری قابلیت تشکیل بیوفیلیم و اتصال به سطوح را می‌دهد و به این ترتیب نقش مهمی در عفونت زایی پاتوژن‌ها دارند (۲۱، ۲۶). هرچند تاکنون واکسن موثری علیه این باکتری ایجاد نشده است، اما موارد متعددی به عنوان کاندیداهای واکسن علیه /اسیتوباکتر بومانی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. برخی از واکسن‌هایی که تاکنون در این زمینه مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته

در نتیجه تراکم و شلوغی بیشتر مراکز درمانی و تشخیصی، افزایش بیماران با نقص سیستم ایمنی و بیماری‌های مزمن و ظهور میکروارگانیزم‌های نوپدید و مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از اولویت‌های حیاتی سیستم‌های بهداشتی و درمانی هر کشور محسوب می‌شود (۴-۲). /اسیتوباکتر بومانی پاتوژن فرصت طلبی است که همواره به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای عفونت‌های بیمارستانی شناسایی شده است (۵). /اسیتوباکتر بومانی یک کوکوباسیل گرم منفی است که به عنوان یکی از عوامل عفونی فرصت طلب مطرح است (۶-۸). کشف اسیتوباکتر به سال 1911 میلادی بر می‌گردد. این باکتری بیماریزا که اولین بار از خاک جدا شده بود، ابتدا میکروکوکوس کالکواستیکوس نامیده شد. برای چندین سال، باکتری‌های این گروه با نام‌های مختلف نام‌گذاری شدند تا اینکه در دهه ۱۹۵۰ میلادی، نام اسیتوباکتر به کار گرفته شد (۴-۸). /اسیتوباکتر بومانی مسئول طیف وسیعی از بیماری‌ها شامل عفونت ریه، عفونت خون، عفونت زخم و پوست، مننژیت و عفونت دستگاه ادراری می‌باشد (۹). باکتری‌های جنس اسیتوباکتر از نظر باکتری‌شناسی و ویژگی‌های بیوشیمیایی، هوازی اجباری، نامتحرک و فاقد تازک، غیرتخمیرکننده، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی هستند (۱۰-۱۲). /اسیتوباکتر بومانی به اغلب آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم است (۸)؛ به طوری که کنترل عفونت حاصل از این باکتری با گروه‌های آنتی‌بیوتیکی نظیر کاربامپنم‌ها، فلوروکوئینولون‌ها و آمینوگلیکوزیدها با شکست روبرو شده است. جدیدترین آنتی‌بیوتیکی که برای کنترل عفونت /اسیتوباکتر بومانی مورد استفاده قرار گرفته است، کولیستین نام دارد، اما گزارش‌های اخیر نیز حاکی از ظهور سویه‌های مقاوم نسبت به این آنتی‌بیوتیک است (۹-۱۴). /اسیتوباکتر بومانی مقاومت چند دارویی (MDR) ایجاد می‌کند که این پدیده توسط انواع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف ثابت شده است از جمله فعال‌سازی پمپ‌های افلاکس، سنتز آنزیم‌هایی مثل فسفریل ترانسفرازها و

وکتور pcDNA3.1 به عنوان یک وکتور بیانی پر قدرت مورد استفاده بوده و دارای پروموتور قوی CMV برای بیان ژن کلون شده در سلول‌های پستانداران می‌باشد. اندازه این وکتور برابر 5428 bp است و نشانگر انتخابی آن ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین می‌باشد. موش‌های BALB/c نیز به عنوان میزبان برای بررسی بیان ژن مورد استفاده قرار گرفت. پس از وارد کردن ژن csuC در وکتور pcDNA3.1، اندازه این وکتور ۶۲۳۵ جفت باز خواهد بود.

استخراج DNA و تکثیر ژن csuC: خالص‌سازی DNA ژنومی از *اسیتوباکتر بومانی* با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) انجام شد. استخراج پلاسمید از باکتری سویه Top10f توسط کیت FavareGene تایوان که LPS-Free می‌باشد، انجام شد. همچنین کیفیت پلاسمید استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (ND-1000 PeqLab) سنجیده شد. غلظت و کیفیت DNA تخلیص شده با استفاده از نانودراپ (ND-1000 PeqLab) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تکثیر ژن csuC ردیف نوکلئوتیدی آن از درون ژنوم ثبت شده *اسیتوباکتر بومانی* در پایگاه بانک جهانی ژن به شماره دسترسی Q6XBY4 گرفته شد. سپس، پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق با کمک نرم افزار Gene Runner طراحی شدند. ردیف نوکلئوتیدی پرایمرهای طراحی شده در این تحقیق در جدول ۱ ثبت شد است.

آزمایش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 10X، ۲ میلی مولار MgCl₂ (۱ میکرولیتر)، ۲۰۰ میکرو-مولار dNTPs (۰/۵ میکرولیتر)، ۱۰۰ نانومولار از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت (۱ میکرولیتر از هر پرایمر)، ۱۰۰ نانوگرم از DNA ژنومی تخلیص شده از *اسیتوباکتر بومانی* (۲ میکرولیتر DNA)، و ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq (۰/۲۵ میکرولیتر) (همه مواد و واکنشگرهای PCR ساخت شرکت سیناژن، ایران) در دستگاه ترمال سایکلر (اپندروف، آلمان) انجام شد.

اند و در حیوانات آزمایشگاهی (اغلب موش) سبب ایجاد ایمنی نسبی شده اند شامل: باکتری کشته شده، کمپلکس پوشش خارجی، و زیکول‌های غشای خارجی، پلی ساکارید کپسولی KI و پروتئین غشای خارجی A می‌باشند (۲۲، ۱۷). واکسن‌های متنوع و متعددی نظیر واکسن‌های ژنی علیه عفونت‌های باکتریایی ابداع شده اند. واکسن ژنی یک نوع واکسن بر پایه DNA است که با تولید آن با روش‌های نوین مهندسی ژنتیک و تزریق آن به موجود زنده، باعث ایجاد پاسخ ایمنی می‌شود. این واکسن می‌تواند در برابر بیماری‌های ناشی از عوامل بیماری‌زای عفونی مثل باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و تک‌یاخته‌ای‌ها و حتی برای سرطان‌ها و بیماری‌ها با منشأ ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد (۲۳، ۳۲).

پروتئین خارج سلولی csuC می‌تواند به عنوان یکی از آنتی‌ژن‌های مهم، جهت ساخت واکسن ژنی مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به اینکه *اسیتوباکتر بومانی* یکی از موفق‌ترین باکتری‌ها در بروز بیماری‌های عفونی است و پروتکل‌های درمانی را معمولاً با شکست روبرو می‌کند و تاکنون واکسن موثری علیه این باکتری تولید نشده است (۵، ۲۴)، لذا یافتن راهی برای پیشگیری از این عامل عفونی خطرناک ضروری به نظر می‌رسد. در همین راستا، در تحقیق حاضر اقدام به همسانه‌سازی، طراحی و کلون‌سازی ژن کدکننده پروتئین چاپرون بیوژنز فیمبریال Csu از باکتری *اسیتوباکتر بومانی* مقاوم به کاربامپنم شد.

مواد و روشها

تهیه میکروارگانیسم‌ها: برای انجام این پژوهش تجربی از دو سویه باکتریایی استفاده شد. به منظور تکثیر و به دست آوردن ژن csuC از سویه استاندارد باکتری *اسیتوباکتر بومانی* (ATCC 19606) (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران، ایران) بهره گرفته شد. میزبان کلون‌سازی ژن و تکثیر وکتورهای نو ترکیب نیز باکتری *E. coli* سویه TOP10F بود. به منظور کلون‌سازی ژن از ناقل pcDNA3.1 استفاده شد.

جدول ۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش

| Primer Name | Sequence (5'to 3') | Length(bp) | Tm |
|----------------|------------------------|------------|------|
| CsuC-F | ATGGTGATCTGCATGAACAAC | 831 | 50.5 |
| CsuC-R | GCTAGGGTCTCCATCTTGG | 831 | 55.9 |
| BALB/c GapDH-F | TGATTCTACCCACGGCAAGTTC | 120 | 54.8 |
| BALB/c GapDH-R | CGTCTCTGGAAGATGGTGATG | 120 | 56.3 |
| RT-CsuC-F | GAAGCATCTTGCTCGTTGCC | 180 | 55.9 |
| RT- CsuC-R | TTCGCTTAACCAAAAAGCGCC | 180 | 55.8 |

داده شدند. پلیت های کشت به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد، گرمخانه گذاری شده و کلونی های حاصل برای غربالگری حضور ژن کلون شده ارزیابی گردیدند. برای تایید حضور ژن کلون شده در وکتور و بررسی تشکیل وکتور نوترکیب از روش های PCR و هضم آنزیمی با آنزیم های برش دهنده (*Bam*HI/*Eco*RV Genray) ، چین) استفاده شد. *csuC* از ناقل T و زیرهمسانه سازی کردن آن در ناقل pcDNA3.1 به دست می آید. بدین منظور، ابتدا ناقل نوترکیب با دو آنزیم *Bam*HI/*Eco*RV برش داده شد تا ژن *csuC* از آن خارج گردد. همچنین، ناقل یوکاریوتی pcDNA3.1 نیز با همین دو آنزیم بریده شد تا به صورت خطی درآید. همه محصولات برش آنزیمی روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. سپس، قطعه ژن *csuC* و ناقل از روی ژل با کمک اسکالپل بریده شدند و با استفاده از کیت تخلیص گردیدند. واکنش اتصال بین ناقل یوکاریوتی pcDNA3.1 و ژن *csuC* با کمک آنزیم T4-لیگاز (سیناژن، ایران) انجام شد و مراحل ترانسفورماسیون محصولات اتصال به درون باکتری *E. coli* سویه TOP10F انجام شد. به منظور تأیید صحت ساب کلونینگ و بررسی تشکیل سازواره نهایی pcDNA3.1 حاوی ژن *csuC* ابتدا واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت مخصوص ژن *csuC* انجام گرفت. برای تایید بیشتر و دقیقتر سازواره نهایی هضم آنزیمی با آنزیم های *Bam*HI/*Eco*RV و تعیین توالی صورت پذیرفت. تعیین توالی ژن موردنظر به روش سانگر و توسط شرکت Genray کشور چین انجام شد.

برنامه دمایی شامل ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی به صورت تک مرحله ای در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، سپس، ۳۲ چرخه دمایی متناوب شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پس از انجام PCR محصولات آن به چاهک های ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل شده و در ۹۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شدند و با نور ماورای بنفش مشاهده گردیدند.

کلون سازی ژن چاپرون: برای کلون سازی مرحله لازم است قطعه خالصی از ژن *csuC* تهیه شده و در وکتور درج گردد. در تحقیق حاضر قطعات تکثیر شده ژن *csuC* روی ژل آگارز الکتروفورز شدند و در برابر نور ماورای بنفش با طول موج بالا، قطعه DNA مربوط به ژن *csuC* با آگارز همراه آن با استفاده از اسکالپل بریده شد. ژن *csuC* با استفاده از کیت خالص سازی DNA از ژل (Bioneer، کره جنوبی) تخلیص شد. واکنش اتصال بین محصولات PCR و وکتور براساس روش کار کیت صورت پذیرفت. ترانسفورماسیون محصول اتصال در باکتری *E. coli* سویه TOP10F به روش شیمیایی (با کاربرد ۰/۱ مولار) و متعاقب آن با انجام شوک حرارتی (۴۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه) مطابق روش های استاندارد انجام شد (۳). سپس، باکتری های مذکور روی پلیت کشت LB-آگار حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) کشت

cDNAهای تولید شده انجام شد و نتایج روی ژل آگارز 1 درصد بررسی گردید.

بررسی میزان بیان ژن *csuC* در دوره ۶۰ روزه در عضله چهارسر ران موش های BALB/c به روش Real Time-PCR

برای ارزیابی تغییرات بیان اختصاصی ژن *csuC* در عضله چهارسر ران موش های BALB/c، ابتدا ۱۲ موش از گروه کنترل و ۱۲ موش از گروه هدف انتخاب شدند و در زمان های مختلف از عضله ۴ سر ران ۲ سر موش نمونه گیری شد. میزان بیان ژن چاپرون در روزهای ۲، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۶۰ بررسی شد. برای این منظور عضله ۴ سر ران موش پس از استخراج RNA و سنتز cDNA توسط آزمون Real Time-PCR بررسی شد و نتایج توسط آزمون آماری لیواک سنجیده شد.

آنالیز آماری: در این پژوهش محاسبه آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام گردید و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. تفاوت بیان ژن های هدف، بین نمونه های کنترل و تیمار شده با روش آماری Tukey's HSD post-hoc test محاسبه گردید. اطلاعات به صورت $mean \pm standard deviation$ نمایش داده شده اند و مرز معناداری روی $P < 0.05$ و $P < 0.001$ قرار گرفته شد.

نتایج

تکثیر ژن *csuC* /سیتوباکتر بومانی: در پژوهش حاضر تخلیص DNA ژنومی از سویه استاندارد باکتری /سیتوباکتر بومانی با موفقیت انجام شد. نتایج الکتروفورز DNA تخلیص شده روی ژل آگارز نشان دهنده کیفیت مناسب آن و بررسی غلظت DNA خالص سازی شده با نانودراپ نشان دهنده مقدار ۱۴۰ نانوگرم در هر میکرولیتر بود. نتایج انجام PCR برای ژن *csuC* روی ژنوم /سیتوباکتر بومانی منجر به تشکیل باندها ۸۳۱ جفت بازی مربوط به این ژن

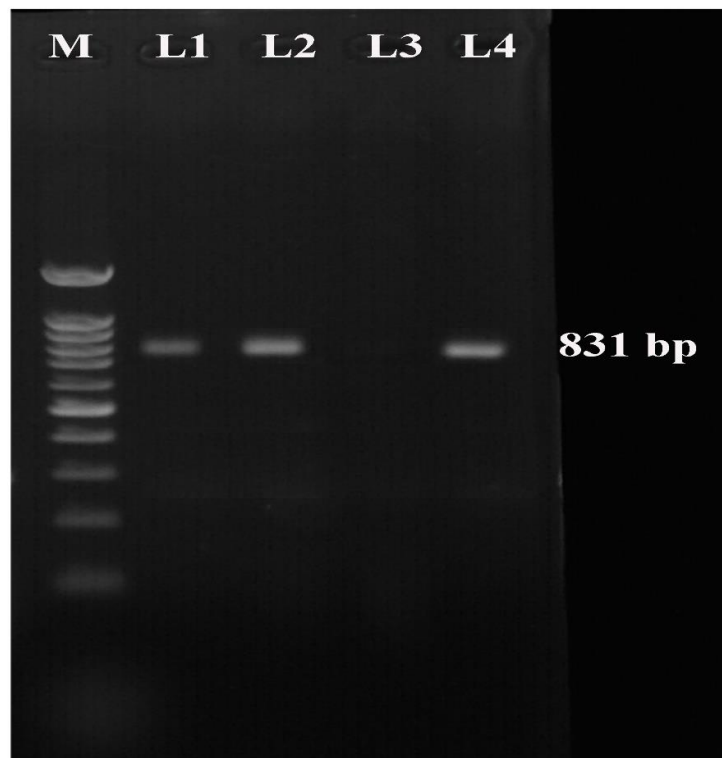
تزریق سازواره نهایی *pcDNA3.1-csuC* به موش های BALB/c: آزمایشات این مرحله با هدف انتقال سازواره نهایی حامل ژن *csuC* به موش های BALB/c انجام شد. برای این منظور ۳۴ عدد موش ۵ هفته ای BALB/c ماده، به وزن ۲۰ گرم تهیه و در ۲ گروه دسته بندی شدند. گروه کنترل مقدار ۱۰۰ میکرولیتر PBS در قسمت عضله چهارسر ران دریافت نمود. سپس به گروه هدف، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سازواره نهایی *pcDNA3.1-csuC* با غلظت 100ng/ml در محل عضله چهارسر ران تزریق شد. ۱ ماه پس از تزریق، موش ها بوسیله فرمالین بی هوش شده و عضله ۴ سر ران با تیغ اسکالپل برداشته شد و به سرعت در ازت مایع ۱۸۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت.

بررسی بیان ژن *csuC* در عضله چهارسر ران موش های BALB/c به روش RT-PCR: برای ارزیابی بیان اختصاصی ژن *csuC* در عضله چهارسر ران موش های BALB/c، ابتدا استخراج RNA از بافت عضله ۵ سر موش (۵ سر گروه هدف، ۵ سر گروه کنترل) با استفاده از کیت YTzol Pure RNA (ایران، یکتاتجهیز) انجام شد. سپس، تهیه cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (یکتاتجهیز، ایران) بر اساس روش کار کیت صورت پذیرفت. واکنش رونوشت برداری معکوس (RT) برای تهیه cDNA با استفاده از ۲ میکرولیتر بافر RT 10X، 4 میکرولیتر RNA تخلیص شده از عضله چهارسر ران موش های BALB/c (۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر)، ۱ واحد آنزیم رونوشت بردار معکوس (۱ میکرولیتر)، ۱ واحد آنزیم RNase Inhibitor (۱ میکرولیتر)، 2 میکرو لیتر Random Hexamer Primers (۱۰۰ نانومول) و با افزودن ۱۰ میکرولیتر آب مقطر در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنشگرها به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتیگراد و سپس ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد در دستگاه ترمال سایکلر (اپندروف، آلمان) قرار داده شدند. سپس، آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت مخصوص ژن *csuC* روی

آزمایش PCR روی این سازواره باند اختصاصی مربوط به ژن هدف به اندازه ۸۳۱ جفت باز تشکیل شد. هرچند وکتور نوترکیب حاصل شده در این تحقیق حامل ژن *csuC* بود، اما قادر به بیان آن نخواهد بود. لذا مرحله خارج ساختن ژن *csuC* از ناقل و انتقال آن به پلاسمید یوکاریوتی pcDNA3.1 انجام شد (جدول ۱ کمکی).

شد. نتایج PCR در شکل ۱ نشان داده شده است. از باکتری استاندارد/اسیتوباکتر بومانی 19606 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

نتایج مراحل کلونسازی ژن *csuC*: نتیجه‌ی واکنش اتصال بین ناقل و قطعه ژن *csuC* منجر به تشکیل سازواره نوترکیب شد. بررسی درستی تشکیل سازواره نوترکیب با PCR نشان دهنده موفقیت آزمایش بود. در واقع با انجام

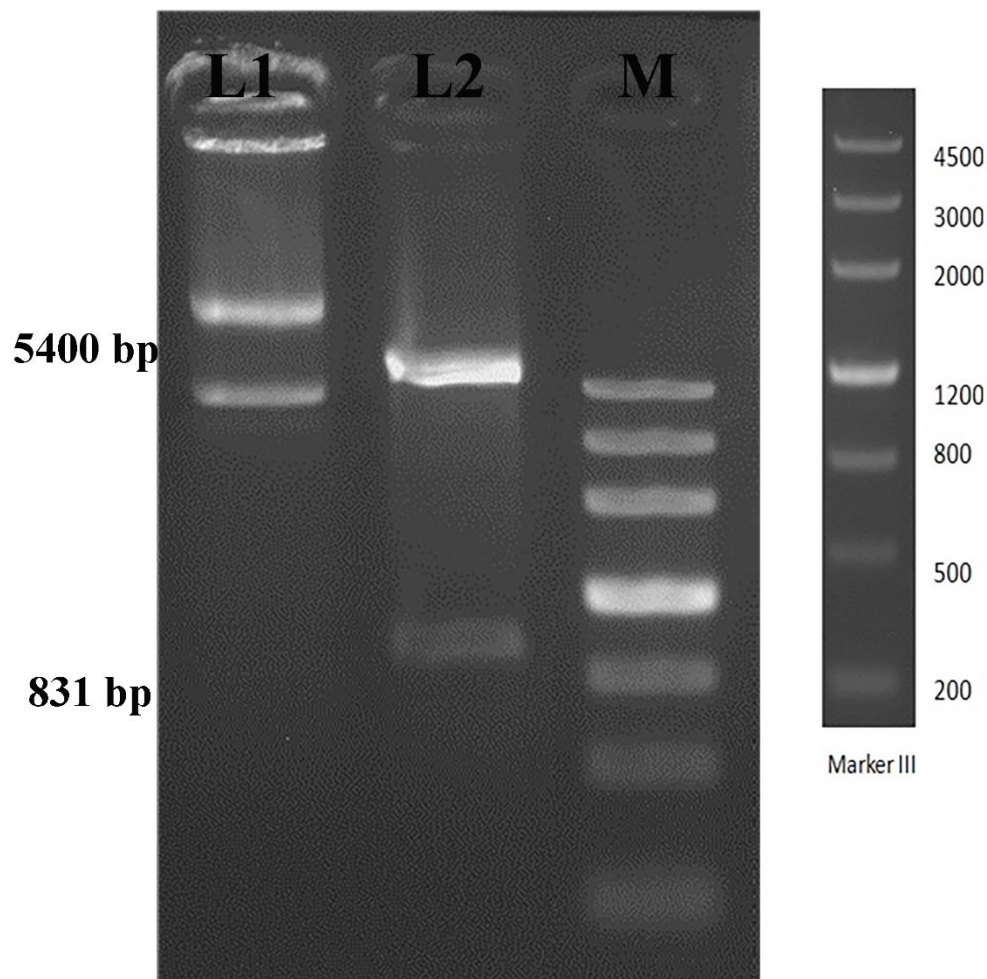


شکل ۱- نتیجه آزمایش PCR برای تکثیر ژن *csuC* اسیتوباکتر بومانی

M: نشانگر DNA ۱۰۰ جفت بازی، L1, L2: باند ۸۳۱ جفت بازی مربوط به تکثیر ژن *csuC* L3: کنترل منفی (بدون DNA)، L4: باند ۸۳۱ جفت بازی مربوط به باکتری استاندارد/اسیتوباکتر بومانی ATCC19606 کنترل مثبت

نتایج تعیین توالی قطعه ژن *csuC* کلون شده در وکتور pcDNA3.1 پس از مقایسه با توالی‌های موجود از این ژن در پایگاه داده‌های NCBI نشان دهنده این بود که هیچ گونه تغییر نوکلئوتیدی در اجزای سکانس این ژن به وجود نیامده و صحت توالی آن مورد تایید است. تعیین ترادف انجام و عدم وجود خطا در ژن با آنالیزهای همردیفی به اثبات رسیده است.

زیرهمساز ژن *csuC* درون وکتور pcDNA3.1 نتایج موفقیت‌آمیزی در پی داشت. تایید صحت ساب کلونینگ با روش‌های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی انجام گرفت و یافته‌های حاصل از این آزمایشات صحت تشکیل سازواره نهایی pcDNA3.1-*csuC* را نشان داد. برش آنزیمی این پلاسمید تشکیل دو باند حدوداً ۵۴۰۰ و ۸۳۱ جفت بازی که به ترتیب مربوط به وکتور pcDNA3.1 و ژن *csuC* می‌باشند را روی ژل آگارز ۱ درصد نمایان کرد (شکل ۲).



شکل ۲- برش آنزیمی ناقل نوترکیب نهایی *pcDNA3.1-csuC* با آنزیم های *BamHI/EcoRV*

M: مارکر DNA ، L1: ناقل نوترکیب نهایی *pcDNA3.1-csuC* ، L2: باندهای ۸۳۱ و ۵۴۰۰ جفت بازی حاصل از برش ناقل با آنزیم های *BamHI/EcoRV*

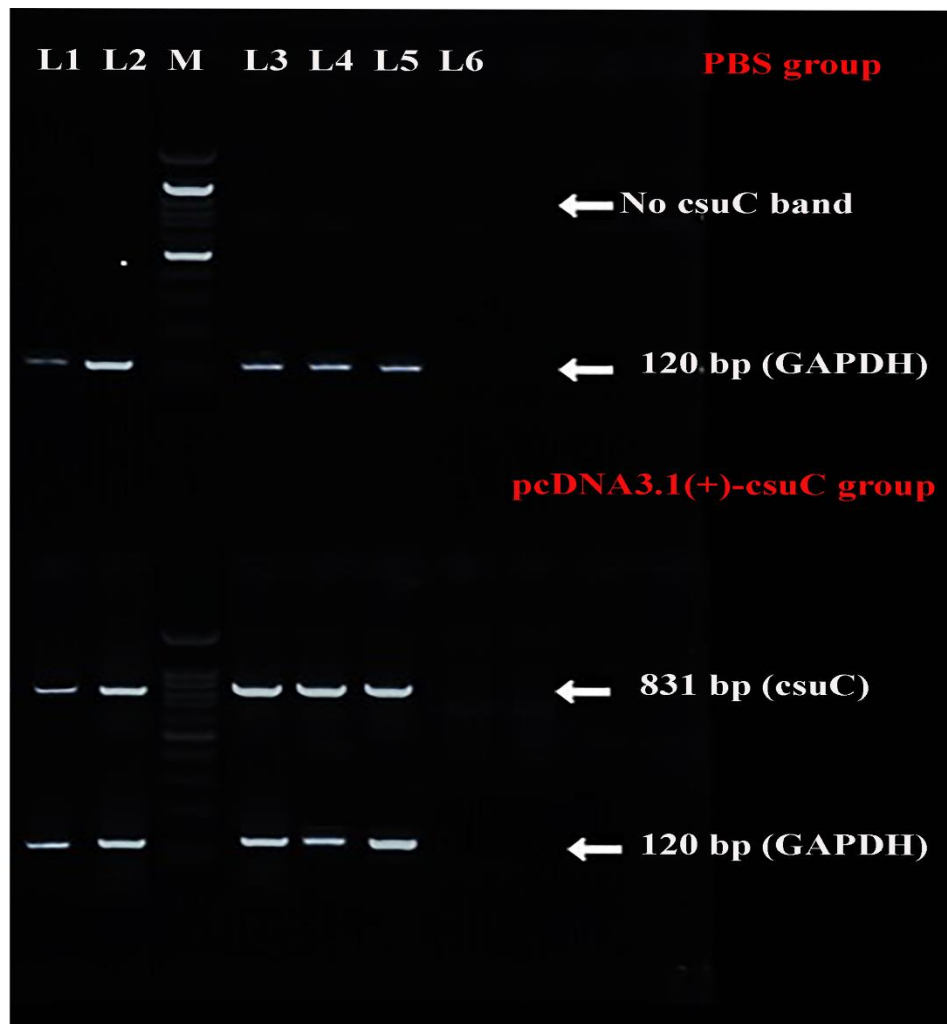
عضله مثبت بود. به طوریکه پس از انجام PCR روی cDNA های حاصل از آزمایش RT-PCR برای بافت عضله چهارسر ران موش های BALB/c در گروه هدف، هر ۵ موش موجود در این گروه ، باند ۸۳۱ جفت بازی مربوط به ژن *csuC* تشکیل شد. اما همین آزمایش برای گروه کنترل که فقط PBS دریافت کرده بودند (فاقد وکتور نوترکیب) مثبت نبود. نتایج این آزمایش مویذ رونویسی موفق و ۱۰۰ درصدی ژن *csuC* در بافت عضله چهار سر ران موش می‌باشد.

نتایج بررسی رونویسی ژن *csuC* در عضله چهارسر ران موش های BALB/c به روش RT-PCR: برای اثبات ورود سازواره نهایی-*pcDNA3.1-csuC* که بیان کننده ژن *csuC* در عضله چهارسر ران موش های BALB/c است، از روش RT-PCR بهره گرفته شد. میزان رونویسی ژن *csuC* در بافت عضله چهارسر ران موش نشان دهنده فعالیت موفق وکتور-*pcDNA3.1-csuC* در بافت عضله و انتقال موفق این وکتور به سلول‌های بافت عضله است. نتایج حاصل از انجام واکنش اختصاصی RT-PCR برای تایید رونویسی ژن *csuC*/سیتوباکتر بومانی در بافت

همچنین همان‌طور که در شکل ۴ دیده می‌شود گروه هدف با باند ۸۳۱ جفت بازی نشان دهنده بیان ژن *csuC* در بافت عضله چهار سر ران موش می‌باشد. اما در گروه کنترل فقط ژن GAPDH باند ۱۲۰ جفت بازی را نشان داد که بیان این ژن رفرنس مشخص کننده صحیح بودن آزمایش می‌باشد.

جدول ۲- نتایج بررسی بیان ژن *csuC* در عضله چهار سر ران موش BALB/c

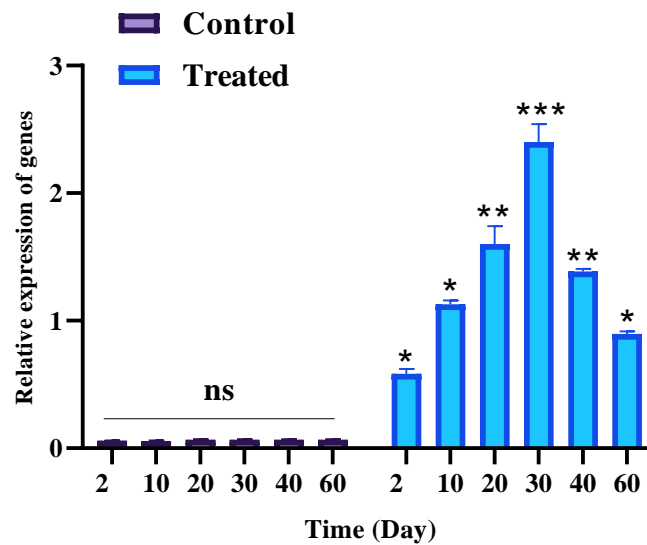
| وجود باند ۸۳۱ جفت بازی در RT-PCR حاصل از عضله ۴ سر ران | | نمونه |
|--|----------------------------|-------|
| گروه کنترل PBS | گروه pcDNA3.1- <i>csuC</i> | |
| - | + | 1 |
| - | + | 2 |
| - | + | 3 |
| - | + | 4 |
| - | + | 5 |

شکل ۴- نتایج RT-PCR از عضله چهار سر ران در گروه‌های pcDNA3.1-*csuC* و گروه PBS

M: DNA Ladder ۱۰۰ جفت بازی L1-L5: نمونه‌های موش آزمایش شده L6: مسترمیکس فاقد DNA به عنوان کنترل منفی واکنش PCR

نسبت به گره کنترل با سیکل آستانه ۲۸ ($ct=28$) در سطح $P<0.001$ معنادار بود. افزایش بیان ژن ۴۰ روز پس از تزریق به سطح معناداری $P<0.01$ کاهش یافت. این کاهش میزان بیان تا روز ۶۰ پس از تزریق ادامه داشت ($P<0.05$) و سیکل آستانه در گروه هدف به ۲۳ ($ct=23$) رسید ($P<0.05$). داده‌های آزمون Real Time PCR توسط ژن رفرنس GAPDH موشی نرمال سازی شد.

نتایج بررسی تغییرات بیان ژن *csuC* در عضله چهارسر ران موش‌های BALB/c در طول ۶۰ روز: نتایج بررسی تغییرات بیان ژن در گروه هدف نسبت گروه کنترل مقایسه شد. گروه کنترل بیان ژن *csuC* در هیچ یک از موش‌ها مشاهده نشد. اما در گروه هدف میزان بیان ژن هدف پس از ۲ روز افزایش بیان قابل توجهی را نشان داد. این افزایش بیان تا روز ۳۰ پس از تزریق به بالاترین سطح خود رسید و میزان سیکل آستانه به ۱۸ ($ct=18$) رسید که اختلاف بیان



شکل ۵- نتایج تاثیر زمان بر تغییرات بیان ژن در بافت عضله چهار سر ران موش. میزان بیان تا ۳۰ روز پس از تزریق افزایشی ($P<0.001$)، و پس از آن کاهش بیان تا روز ۶۰ پس از تزریق مشاهده شد. $***P<0.001$, $**P<0.01$, $P<0.05$, ns $P>0.05$.

در این تحقیق، ژن مؤثر در بیماری‌زایی و تشکیل بیوفیلم *اسیتوباکتر بومانی* و کاندیدای واکسن، جداسازی و کلون شدند. در مطالعه حاضر از پلاسمید *pcDNA3.1* برای کلون کردن ژن *csuC* جهت تهیه واکسن ژنی استفاده شد، پلاسمید *pcDNA3.1* مدت هاست که جهت کلونینگ با بازده بالا معرفی شده است (۲۰، ۳۴).

سازواره ژنی به دست آمده در این تحقیق پتانسیل تولید محصول ژن *csuC* را داشت. بررسی رونویسی این ژن در سطح RNA در بافت عضله چهار سر ران موش BALB/c ارزیابی شد و نتایج آزمایش RT-PCR نشان از موفقیت آمیز بودن رونویسی این ژن در بافت موش داشت. سازواره

بحث

به علت افزایش روزافزون مقاومت دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در سال‌های اخیر، شاهد حضور ایزوله‌هایی از *اسیتوباکتر بومانی* با الگوی مقاومت دارویی چندگانه (MDR) هستیم که از نقاط مختلف جهان گزارش می‌شوند (۲، ۲۵-۲۹). افزایش مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی و محدود بودن گزینه‌های درمانی، مشکلات جدی در مراکز درمانی به ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه است که سلامت و اقتصاد کشور را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۰-۳۳).

گروه تایید کرد که ساختار نوترکیبی قادر به القا پاسخ ایمنی در موش‌های ایمن شده است. این یافته‌ها نشان داد که *pEGFP-C2-NlpA* ممکن است به عنوان کاندید واکسن DNA علیه *Ab* در نظر گرفته شود (۱۳). *Huang* و همکاران در سال ۲۰۱۶ نیز به بررسی آنتی‌ژن‌های بیشتر پرداخته و پروتئین *Omp22* را نیز به عنوان هدف واکسن معرفی کردند (۱۴). *Garg* و همکاران در سال ۲۰۱۶ نوکلئاز غشای خارجی (*NucAb*) /*اسیتوباکتر بومانی* را به عنوان هدف واکسن شناسایی و نقش آن را در بهبود بقا در حیوانات آزمایشگاهی نشان دادند (۱۲).

در سال 2016 *Singh* و همکاران با استفاده از واکسینولوژی معکوس از بین 57 پروتئین مورد بررسی از باکتری مذکور، پروتئین غشای خارجی *FilF* (پیلوس) را مناسب یافتند. پروتئین *FilF* در بین سویه‌های مختلف *اسیتوباکتر بومانی* توالی اسید آمینه‌ای حفظ شده‌ای دارد. این محققان ژن *filF* را از ژنوم *اسیتوباکتر بومانی* جداسازی کرده و در وکتور بیانی پروکاریوتی *pET-28a* کلون‌سازی نمودند و بیان این ژن را در باکتری *E. coli* سویه BL21 بررسی کردند (۳۰). افزایش مطالعات واکسن ژنی نگرانی‌هایی از قبیل درج احتمالی توالی ژن در ژنوم میزبان را افزایش داده است. اما با وجود مطالعات گوناگون تا کنون نمونه‌ای برای اثبات این نگرانی وجود نداشته است.

Nie و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه‌ای عنوان کردند که پروتئین *OmpA* می‌تواند به عنوان هدف درمانی برای *اسیتوباکتر بومانی* باشد. (۲۱). *Hashemi* و همکاران در سال ۲۰۱۹ به بررسی کارآیی پپتیدهای طراحی شده کاندید واکسن از پروتئین غشای خارجی *اسیتوباکتر بومانی* با آنتی‌بادی‌های سرمی پرسنل شاغل در بخش ICU (intensive care unit) پرداختند. (۲۴). *Huang* و همکاران به بررسی ژن *ompW* باکتری *اسیتوباکتر بومانی* پرداختند. این محققان ژن *ompW* را بین دو سایت آنزیمی *BamHI* و *EcoRI* در پلاسمید *pThioHisA* کلون‌سازی نمودند و

نوترکیب *pcDNA3.1-csuC* از دو دیدگاه پتانسیل کاربرد در تحقیقات در زمینه واکسن‌های نوترکیب را دارد. اول جنبه این که می‌توان محصول پروتئینی آن را تولید نموده و به عنوان واکسن پپتیدی نوترکیب مورد بررسی قرار داد. دیدگاه دوم اینکه این ناقل یوکاریوتی امکان کاربرد به صورت واکسن ژنی در راستای تحقیقات واکسیناسیون علیه *اسیتوباکتر بومانی* در مدل حیوانات آزمایشگاهی را دارد.

در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی در زمینه یافتن واکسن علیه *اسیتوباکتر بومانی* انجام شده است. در یک تحقیق صورت گرفته توسط انصاری و همکاران در سال 2017، محققان این طرح با تزریق پروتئین نوترکیب *OmpA* مربوط به باکتری *اسیتوباکتر بومانی* به موش، القای بالای آنتی‌بادی ضد *OmpA* را مشاهده نمودند. همچنین، تیتراژ بالای IgG در موش‌های واکسینه شده نسبت به گروه شاهد دیده شد (۱). ایمنی زایی پروتئین‌های فیمبريال در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است اما تاکنون مطالعه‌ای بر روی ایمنی زایی پروتئین چاپرون فیمبريال *csu* در *اسیتوباکتر بومانی* انجام نشده است. در مطالعه‌ای که در سال 2013 انجام شد محققان اقدام به کلون‌سازی ژن *ompA* /*اسیتوباکتر بومانی* نمودند. در این تحقیق محصول پروتئینی این ژن به صورت نوترکیب تولید و تخلیص گردید. در نهایت، تزریق دوزهای مختلف پروتئین نوترکیب به موش به همراه هیدروکسید آلومینیوم به عنوان ادجوانت نشان داد که *OmpA* /*اسیتوباکتر بومانی* قادر به تحریک سیستم ایمنی میزبان در سطوح مختلف است (۱۹). در سال‌های اخیر تحقیقات مهندسی ژنتیک در زمینه کلون‌سازی و کاربرد ژن‌های *اسیتوباکتر بومانی* بیشتر شده است. مثلاً *Hashemzahi* و همکاران در سال ۲۰۱۸ ژن *NlpA* را به عنوان واکسن‌ژنی در *اسیتوباکتر بومانی* بررسی کرد. از طریق این مطالعه *pEGFP-C2-NlpA* نوترکیب تولید شد و با موفقیت ژن *NlpA* را در سلول‌های یوکاریوتی بیان کرد. علاوه بر این، مطالعه *in vivo* این

برای انجام تحقیقات آینده استفاده کرد. از طرف دیگر، سازواره نهایی *pcDNA3.1-csuC* که از ترکیب ناقل بیانی یوکاریوتی *pcDNA3.1* به علاوه ژن *csuC* به دست آمده است، می‌تواند در زمینه تولید واکسن‌های نوترکیب به صورت بیان ژن *csuC* و تولید محصول پروتئینی و خالص سازی آن با اهداف کاربردی به صورت واکسن پپتیدی مدنظر قرار گیرد. همچنین، بیان اولیه و موفق ژن *csuC* در عضله ۴ سر ران موش BALB/c که در پژوهش حاضر محقق شد، راهی روشن در راستای کاربرد *pcDNA3.1-csuC* به عنوان واکسن ژنی در مدل حیوانی پیش رو قرار می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دانشجوی دکتری تخصصی است. محققان و نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از تمامی همکاران و محققانی که ما را در به ثمر رسیدن این پایان‌نامه یاری نمودند به خصوص خانم دکتر فرانک عالی، اعلام نمایند.

سازواره نوترکیب را به باکتری *E. coli* سویه BL21 منتقل نمودند. این ژن در باکتری میزبان بیان بسیار بالایی را نشان داد. در تحقیق مذکور برخلاف تحقیق ما از وکتور پروکاریوتی استفاده شده بود، اما شباهت آن استفاده از یکی از ژن‌های مهم و آنتی ژنتیک /سیتوباکتر بومانی است (۱۵، ۳۵، ۳۶). مزیت محصول به دست آمده در تحقیق ما (سازواره نهایی *pcDNA3.1-csuC*) در این است که رونویسی موفق را در بافت عضله ۴ سر ران موش BALB/c نشان داد و امکان کاربرد به صورت تزریق مستقیم به عضله حیوان آزمایشگاهی را به عنوان واکسن ژنی دارد. اما کاستی‌های آن ممکن است عدم جذب کافی این وکتور نوترکیب توسط سلول‌های عضلانی حیوانات مدل، در صورت تزریق به صورت مستقیم باشد که در این صورت سبب کاهش تولید محصول ژن نوترکیب و عدم وجود ایمنی زایی کافی خواهد شد.

در مطالعه حاضر ژن *csuC* باکتری بیماری‌زای /سیتوباکتر بومانی به طور موفقیت‌آمیز در ناقل نوترکیب درج شد و سازواره نوترکیب *pcDNA3.1-csuC* حاصل گردید. با توجه به صحت نتایج به دست آمده از تعیین توالی می‌توان از سازواره *pcDNA3.1-csuC* به عنوان منبعی از ژن هدف

جدول کمکی ۱- توالی ساختاری پلاسمید طراحی شده

| | |
|--------|--|
| BglIII | |
| | |
| 1 | GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATG 60 |
| | CTGCCTAGCCCTCTAGAGGGCTAGGGGATACCAGTGAGAGTCATGTTAGACGAGACTAC |
| 61 | CCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCG 120 |
| | GGCGTATCAATTCGGTCATAGACGAGGGACGAACACACAACCTCCAGCGACTCATCACGC |
| 121 | CGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCTGC 180 |
| | GCTCGTTTTAAATTCGATGTTGTTCCGTTCCGAAGTGGCTGTTAACGTACTTCTTAGACG |
| NruI | |
| | |
| 181 | TTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATT 240 |
| | AATCCCAATCCGCAAAACGCGACGAAGCGCTACATGCCCGGTCTATATGCGCAACTGTAA |
| 241 | GATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATA 300 |
| | CTAATAACTGATCAATAATTATCATTAGTTAATGCCCCAGTAATCAAGTATCGGGTATAT |
| 301 | TGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACC 360 |
| | ACCTCAAGGCGCAATGTATTGAATGCCATTTACGGGCGGACCGACTGGCGGGTTGCTGG |
| 361 | CCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC 420 |

GGGCGGGTAACTGCAGTTATTACTGCATACAAGGGTATCATTGCGGTTATCCCTGAAAGG

421 ATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT 480
TAACTGCAGTTACCCACCTCATAAAATGCCATTTGACGGGTGAACCGTCATGTAGTTCACA481 ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATT 540
TAGTATACGGTTCATGCGGGGGATAACTGCAGTTACTGCCATTTACCGGGCGGACCGTAA541 ATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCA 600
TACGGGTCATGTACTGGAATACCCTGAAAGGATGAACCGTCATGTAGATGCATAATCAGT601 TCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTG 660
AGCGATAATGGTACCACTACGCCAAAACCGTCATGTAGTTACCCGCACCTATCGCCAAAAC661 ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCACC 720
TGAGTGCCCTAAAGGTTTACAGGTTGGGGTAACTGCAGTTACCCTCAAACAAAACCGTGG721 AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCG 780
TTTTAGTTGCCCTGAAAGGTTTTACAGCATTGTTGAGGCGGGTAACTGCGTTTACCCGC781 GTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCA 840
CATCCGCACATGCCACCCTCCAGATATATTCGTCTCGAGAGACCGATTGATCTCTTGGGT

T7 prom(863,881)>>>

841 CTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGC 900
GACGAATGACCGAATAGCTTTAATTATGTGAGTGATATCCCTCTGGGTTTCGACCGATCG

HindIII KpnI ORF_1 rf(2)(935,1768)>>>

901 GTTTAAACTTAAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCATGGTGATTTGTATGAACAATTCTGC 960
CAAATTTGAATTCGAACCATGGCTCGAGCCTAGGTACCACTAAACATACTTGTAAAGACG961 ATTTATTAATAAATGGCATTTTAAAAATCTTTTTTATTTGCAAGTACATTATCACTTGTAC 1020
TAAATAATTTTTACCGTAAAATTTAGAAAAATAAACGTTTCATGTAATAGTGAACAATG1021 ACCTGTGATGGCACAAGCAACTTTTCTAATTTGGCCGATTTATCCAAAAATAGAAGCCAA 1080
TGGACACTACCGTGTTTCGTTGAAAAGATTAACCCGGCTAAATAGGTTTTTATCTTCGGTT1081 TGAAAAGGCAACTGCGGTTTGGCTTCAAATACGGGTAAGACCGATGCAATGGTGCAAAT 1140
ACTTTTCCGTTGACGCCAAACCGAAGTTTTATGCCCATTTGGCTACGTTACCACGTTTA1141 TCGGGTATTTAAATGGAATCAAGATGGCTTAAAAGATAACTATAGTGAGCAATCAGAAAT 1200
AGCCATAAATTTACCTTAGTTCTACCGAATTTTCTATTGATATCACTCGTTAGTCTTTA1201 TATACCAAGCCCGCTGTAGCCAAAATTAAGCAGGCGAGAAGCATATGCTTCGCTTAAC 1260
ATATGGTTTCGGGCGGACATCGGTTTTAATTCGTCCGCTCTTCGTATACGAAGCGAATG1261 CAAAAGCGCCAATTTGCCGGATGGGAAAGAGCAGTCATATCGTCTGATTGTAGATGAGTT 1320
GTTTTTCGCGTTAAACGGCCTACCTTTCTCGTCAGTATAGCAGACTAACATCTACTCAA1321 ACCGATTCGACTTTCTGATGGCAATGAGCAAGATGCTTCTAAAGTAAGTTTCCAAATGCG 1380
TGGTAAAGCTGAAAGACTACCGTTACTCGTCTACGAAGATTTCAATCAAAGGTTTACGC1381 TTACTCAATTCCATTGTTTGGCTTATGGGAAAGGAATTGGCAGTGGCTTAAACCGAAGAAAAG 1440
AATGAGTTAAGGTAACAAACGAATACCCTTCTTAAACCGTACCGAATTGGCTTCTTTC1441 TCAAAAACCTAATGCAAAAAATGCTTTAGCAAAACCGGTTTTACAGTGGTCAAGTTTCGCAA 1500
AGTTTTTGAATTACGTTTTTACGAAATCGTTTTGGCCAAAATGTCACCAGTCAAGCGTT1501 TAATCAACAAGCCAGCCTGAGCTATATCTTAAAAATAATGGTCAAAAGTTTGCAGCTCT 1560
ATTAGTTGTTCCGGTCCGACTCGATATAGAATTTTTATTACCAGTTTTCAAACGCGCAGA

EcoRV

1561 TTCGGCACTGAAAACCTCAAAAACAGGTAATGATATCTCTTTAGGAAAAGGCTGCTTTTGG 1620
AAGCCGTGACTTTTGAAGTTTTTGTCCATTACTATAGAGAAATCCTTTCCGACGAAAACC1621 CTATGTTTTATCAAATAGCACTGTAAAGTTTGGCTATTGATCAGTCAACGGCAGATGAGTT 1680
GATACAAAATAGTTTTATCGTGACATTTCAAACGATAACTAGTCAGTTGCCGTGACTCAA

1681 GTCAAAAACATCTAAAATTTATGGTGTGGACAGTTCTGGTATTAAACAAGAATTGATCGA 1740

CAGTTTTTGTAGATTTTAAATACCACACCTGTCAAGACCATAATTTGTTCTTAACTAGCT

NotI XhoI XbaI

1741 AATCACCAAAATGGAGGATCCATCATGACAGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGG 1800
TTAGTGGTTTTACTCCTAGGTAGTACTGTCTGTCCACCGCCGGGAGCTCAGATCTCCC

ApaI

1801 CCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT 1860
GGGCAAATTTGGGCGACTAGTCGGAGCTGACACGGAAGATCAACGGTCGGTAGACAACAA

1861 TGCCCCCTCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAGTGCCTTTCTCTAA 1920
ACGGGGAGGGGACGGAAGGAAGTGGGACCTCCACGGTGAGGGTGACAGGAAAGGATT

1921 TAAATGAGGAAATTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGG 1980
ATTTACTCCTTAAACGTAGCGTAACAGACTCATCCACAGTAAGATAAGACCCCCACCC

1981 GTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCG 2040
CACCCCGTCTGTCTCCCCCTCTAACCCTTCTGTTATCGTCCGTACGACCCCTACGC

2041 GTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTTAGGGGGTATCCCCAC 2100
CACCCGAGATACCGAAGACTCCGCCTTCTTGGTGCACCCCGAGATCCCCATAGGGGTG

f1 origin(2116,2422)>>>

2101 GCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCT 2160
CGCGGGACATCGCCGCGTAATTCGCGCCGCCACACCACCAATGCGCGTCCGACTGGCGA

2161 ACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACG 2220
TGTGAACGGTTCGCGGGATCGCGGGCGAGGAAAGCGAAAGAAGGAAAGGAAAGAGCGGTGC

2221 TTCGCCGGCTTTCGCCGTCAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGGATTTAGT 2280
AAGCGGCGGAAAGGGGAGTTCGAGATTTAGCCCCGAGGGAAATCCCAAGGCTAAATCA

2281 GCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCA 2340
CGAAATGCCGTGGAGCTGGGGTTTTTTGAACTAATCCCACTACCAAGTGCATCACCCGGT

2341 TCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGA 2400
AGCGGACTATCTGCCAAAAAGCGGAAACTGCAACCTCAGGTGCAAGAAATTATCACCT

2401 CTCTTGTTCAAAAGTGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAA 2460
GAGAACAAGTTTTGACCTTGTGTGAGTTGGGATAGAGCCAGATAAGAAAACTAAATATT

2461 GGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAAC 2520
CCCTAAAACGGCTAAAGCCGATAACCAATTTTTACTCGACTAAATGTTTTTAAATTG

SV40 prom(2554,2822)>>>

SV40ER reg(2532,2767)<<<

2521 GCGAATTAATTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAG 2580
CGCTTAATTAAGACACCTTACACACAGTCAATCCCACACCTTTCAGGGTCCGAGGGGTC

2581 CAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCC 2640
GTCCGTCTTCATACGTTTCGTACGTAGAGTTAATCAGTCGTTGGTCCACACCTTTCAGGG

SV40 prom(2674,2875)>>>

2641 CAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAG 2700
GTCCGAGGGTTCGTCCTTTCATACGTTTCGTACGTAGAGTTAATCAGTCGTTGGTATC

SV40 origin(2721,2798)>>>

2701 TCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCATTCTCCGC 2760
AGGGCGGGGATTGAGGCGGGTAGGGCGGGGATTGAGGCGGGTCAAGGCGGGTAAGAGGCG

2761 CCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGCCGAGGCCCTCTGCCTCTGAGC 2820
GGGTACCGACTGATTAATAAAAAATAAATACGTCTCCGGCTCCGGCGGAGACGGAGACTCG

SmaI

```

                StuI      XmaI
                |        ||
2821 TATTCCAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCCGG 2880
    ATAAGGTCCTTCATCACTCTCCGAAAAAACCTCCGGATCCGAAAAACGTTTTTCGAGGGCC

                ORF_2 rf(3)(2937,3731)>>>
                |
2881 GAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGA 2940
    CTCGAACATATAGGTAAGCCTAGACTAGTTCTCTGTCTACTCTAGCAAAGCGTACT

    NTP_II marker(2940,3728)>>>
    |
2941 TTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCT 3000
    AACTGTCTTACCTAACGTGCGTCCAAGAGGCCGGCGAACCACCTCTCCGATAAGCCGA

3001 ATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGC 3060
    TACTGACCCGTGTGTCTGTTAGCCGACGAGACTACGGCCGCAAGGCCGACAGTCGCG

                NarI      PstI
                |        |
3061 AGGGGCGCCCGTTCTTTTTGCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAGG 3120
    TCCCCGCGGGCCAAGAAAAACAGTTCTGGCTGGACAGGCCACGGGACTTACTTGACGTCC

3121 ACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGTTCTTGGCGAGCTGTGCTCG 3180
    TGTCCTCGTCGCCGATAGCACCGACCGGTGCTGCCGCAAGGAACGCGTCGACACGAGC

3181 ACGTTGTACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATC 3240
    TGCAACAGTGACTTCGCCCTTCCCTGACCGACGATAAACCCTTACGGCCCCGTCTAG

3241 TCCTGTCACTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGC 3300
    AGGACAGTAGAGTGGAACGAGGACGGCTCTTTCATAGGTAGTACCGACTACGTTACGCCG

3301 GGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCG 3360
    CCGACGTATGCGAACTAGGCCGATGGACGGTAAGCTGGTGGTTCGCTTTGTAGCGTAGC

3361 AGCGAGCACGTAAGTTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGC 3420
    TCGCTCGTGCATGAGCCTACCTTCGGCCAGAACAGCTAGTCTACTAGACCTGCTTCTCG

3421 ATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCG 3480
    TAGTCCCCGAGCGCGGTGGCTTGACAAGCGTCCGAGTTCGCGCGTACGGGTGCCCCG

3481 AGGATCTCGTGTGACCCATGCGGATGCGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCC 3540
    TCCTAGAGCAGCACTGGGTACCGCTACGGACGAACGGCTTATAGTACCACCTTTTACCGG

3541 GCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAG 3600
    CGAAAAGACCTAAGTAGCTGACACCGGCCGACCCACACCGCTGGCGATAGTCTGTATC

3601 CGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTCG 3660
    GCAACCGATGGGCACTATAACGACTTCTCGAACCGCCGCTTACCCGACTGGCGAAGGAGC

3661 TGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACG 3720
    ACGAAATGCCATAGCGGCGAGGGCTAAGCGTCCGCTAGCGGAAGATAGCGGAAGAAGTGC

3721 AGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCC 3780
    TCAAGAAGACTCGCCCTGAGACCCCAAGCTTTACTGGTGGTTCGCTGCGGGTTGGACGG

3781 ATCACGAGATTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTT 3840
    TAGTGCTCTAAAGCTAAGGTGGCGGCGGAAGATACTTTCCAACCCGAAGCCTTAGCAAAA

3841 CCGGGACGCCGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCA 3900
    GGCCCTGCGGCCGACCTACTAGGAGGTGCGGCCCTAGAGTACGACCTCAAGAAGCGGGT

3901 CCCCAACTGTTTATTGACGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTT 3960
    GGGGTTGAACAAATAACGTGGAATATTACCAATGTTTATTTCGTTATCGTAGTGTAAAA

3961 CACAAATAAAGCATTTTTTTCAGTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGT 4020
    GTGTTTATTTTCGTAATAAAGTACGTAAGATCAACACCAACAGGTTTGGAGTAGTTACA

4021 ATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATA 4080
    TAGAATAGTACAGACATATGGCAGCTGGAGATCGATCTCGAACCGCATTAGTACCAGTAT

lac prom(4124,4153)<<<

```

4081 GCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAG 4140
CGACAAAGGACACACTTTAAACAATAGGCGAGTGTTAAGGTGTGTTGATGCTCGGCCTTC

4141 CATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCG 4200
GTATTTACATTTCCGACCCACGATTACTCACTCGATTGAGTGAATTAACGCAACGC

4201 CTCACTGCCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCA 4260
GAGTGACGGGCGAAAGGTCAGCCCTTTGGACAGCACGGTCGACGTAATTACTTAGCCGGT

4261 ACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTC 4320
TGCGCGCCCTCTCCGCCAAACGCATAACCCGCGAGAAGGCGAAGGAGCGAGTGACTGAG

4321 GCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAAAAGGCGGTAATACG 4380
CGACGCGAGCCAGCAAGCCGACGCGCTCGCCATAGTCGAGTGAGTTCCGCCATTATGC

4381 GTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAA 4440
CAATAGGTGTCTTAGTCCCCTATTGCGTCTTTCTTGTACTACTCGTTTTCCGGTCTGTTTT

pBR322 origin(4462,5078)<<<

4441 GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGCGGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGA 4500
CCGGTCTTGGCATTTCGCGCGCAACGACCGCAAAAAGGTATCCGAGGCGGGGGACT

4501 CGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG 4560
GCTCGTAGTGTTTTTAGCTGCGAGTTCAGTCTCCACCGCTTTGGGCTGTCTGATATTTT

4561 ATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCTGCCGCT 4620
TATGGTCCGCAAAGGGGGACCTTCGAGGGAGCACGCGAGAGGACAAGGCTGGGACGGCGA

4621 TACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACG 4680
ATGGCCTATGGACAGGCGGAAAGAGGGAAAGCCCTTCGACCCGCGAAAGAGTATCGAGTGC

4681 CTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACC 4740
GACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCAGCAAGCGAGGTTCCGACCCGACACAGTGTCTGG

4741 CCCCCTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGT 4800
GGGGCAAGTCGGGCTGGCGACGCGGAATAGGCCATTGATAGCAGAACTCAGGTTGGGCCA

4801 AAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTA 4860
TTCTGTGCTGAATAGCGGTGACCGTCTGTCGGTGACCATTGTCTAATCGTCTCGCTCCAT

4861 TGTAGGCGGTGTCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAAC 4920
ACATCCGCCACGATGTCTCAAGAACTTACCACCGGATTGATGCCGATGTGATCTTCTTG

4921 AGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTC 4980
TCATAAACCATAGACGCGAGACGACTTCGGTCAATGGAAGCCTTTTCTCAACCATCGAG

4981 TTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTAC 5040
AACTAGGCCGTTTGTGTTGGTGGCGACCATCGCAAAAAAACAACGTTCTGTCGCTAATG

5041 GCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCA 5100
CGCGTCTTTTTTCTAGAGTCTTCTAGGAAACTAGAAAAGATGCCCCAGACTGCGAGT

5101 GTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTAC 5160
CACCTTGCTTTTGTGAGTGAATTCCTAAAACCAGTACTCTAATAGTTTTTCTAGAAAGT

5161 CTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC 5220
GATCTAGGAAAATTTAATTTTACTTCAAAATTTAGTTAGATTTTCATATATACTCATTTG

ORF_3 rf(5)(5233,6093)<<<

amp marker(5233,6093)<<<

5221 TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATT 5280
AACCAGACTGTCAATGGTTACGAATTAGTCACTCCGTGGATAGAGTCGCTAGACAGATAA

5281 TCGTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGCTGTGATAGATAACTACGATACGGGAGGGCTT 5340
AGCAAGTAGGTATCAACGACTGAGGGGCGACACATCTATTGATGCTATGCCCTCCGAA

5341 ACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTT 5400
TGGTAGACCGGGGTCACGACGTTACTATGGCGCTCTGGGTGCGAGTGGCCGAGGTCTAAA

5401 ATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATC 5460
TAGTCGTTATTTGGTTCGGTCCGGCCTTCCCGGCTCGCGTCTTACCAGGACGTTGAAATAG

5461 CGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAA 5520
GCGGAGGTAGGTACAGATAATTAACAACGGCCCTTCGATCTCATCAAGCGGTCAATT

5521 TAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGG 5580
ATCAAACGCGTTGCAACAACGGTAACGATGTCCGTAGCACACAGTGCAGCAGCAAACC

5581 TATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTT 5640
ATACCGAAGTAAGTCGAGGCCAAGGGTGTAGTTCGGCTCAATGTACTAGGGGGTACAA

5641 GTGCAAAAAAGCGGTTAGTCTCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGC 5700
CACGTTTTTTCGCCAATCGAGGAAGCCAGGAGGCTAGCAACAGTCTTCATCAACCGGCG

5701 AGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTATGCCATCCGT 5760
TCACAATAGTGAGTACCAATACCGTCGTGACGTATTAAGAGAATGACAGTACGGTAGGCA

5761 AAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCG 5820
TTCTACGAAAAGACACTGACCACTCATGAGTTGGTTTCAGTAAGACTCTTATCACATACGC

5821 GCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAC 5880
CGCTGGTCAACGAGAACGGGCCGAGTTATGCCCTATTATGGCGGGTGTATCGTCTTG

5881 TTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACC 5940
AAATTTTACAGTAGTAACCTTTTGAAGAAGCCCGCTTTTGAGAGTTCTAGAAATGG

5941 GCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCACTCGTGCACCAACTGATCTTACGATCTTT 6000
CGACAACTTAGGTCAAGCTACATTGGGTGAGCACGTGGGTTGACTAGAAGTCGTAGAAA

6001 TACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGG 6060
ATGAAAGTGGTCGCAAAGACCACTCGTTTTTGTCTTCCGTTTTACGGCGTTTTTTCC

6061 AATAAGGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAG 6120
TTATCCCGCTGTGCCTTTACAACCTATGAGTATGAGAAGGAAAAGTTATAATAACTTC

amp prom(6135,6163)<<<
|

6121 CATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTAGAAAAATAA 6180
GTAAATAGTCCAATAACAGAGTACTCGCTATGTATAAACTTACATAAATCTTTTTATT

6181 ACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC 6229
TGTTTATCCCAAGGCGCGTGTAAGGGGCTTTTACGGTGGACTGCAG

منابع

- 1- Ansari H, Kargar M, Bijanzadeh M, Doosti A. 2017 Cloning and sequencing of the ompA and smpA virulence genes of acinetobacter baumannii isolated in clinical samples.1207-1217.
- 2- Ashuthosh KC, Hegde A, Rao P, Manipura R. 2020. Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii--The Modern Menace: A Retrospective Study in a Tertiary Hospital in Mangalore. Infection and Drug Resistance. 13:2181.
- 3- Beiranvand S, Doosti A, Mirzaei SA. 2021. Putative novel B-cell vaccine candidates identified by reverse vaccinology and genomics approaches to control Acinetobacter baumannii serotypes. Infection, Genetics and Evolution.96:105138.
- 4- Bowler, Philip, Christine Murphy, and Randall Wolcott. 2020. Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? Antimicrobial Resistance & Infection Control.1-5.
- 5- Butler DA, Biagi M, Tan X, Qasmieh S, Bulman ZP, Wenzler E. 2019. Multidrug resistant Acinetobacter baumannii: resistance by any other name would still be hard to treat. Current infectious disease reports.21(12):1-7.
- 6- Chou S-F, Gunaseelan S, Kiellani MHH, Thotempudi VVK, Neuenschwander P, Nie H.

2017. A review of injectable and implantable biomaterials for treatment and repair of soft tissues in wound healing. *Journal of Nanotechnology*.
- 7- Donsì F, Annunziata M, Sessa M, Ferrari G. 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*. 44(9):1908-14.
- 8- Gaddy, Jennifer A., and Luis A. Actis. 2009. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. 2009 273-278.
- 9- Gharaghie, Tohid Piri, Sheida Biranvand, Neda Jegargoshe Shirin, Yalda Elahianfar, Somayeh Ghahari, and Sajjad Ghahari. 2020. Thymol-based Chitosan Nanogels Have Strong Antibacterial and Anti-biofilm Effects on Multidrug-resistant Pathogens. 163-169.
- 10- Gharaghie TP, Beiranvand S, Riahi A, Badmasti F, Shirin NJ, Mirzaie A, Elahianfar Y, Ghahari S, Ghahari S, Pasban K, Hajrasoliha S. 2022. Fabrication and characterization of thymol-loaded chitosan nanogels: improved antibacterial and anti-biofilm activities with negligible cytotoxicity. *Chemistry & biodiversity*. Jan 6.
- 11- Gharaghie P. Tohid, and Seyed Ataollah Sadat Shandiz. 2018. The Inhibitory Effects of Silver Nanoparticles on Bap Gene Expression in Antibiotic-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates using Real-Time PCR. *scientific journal of ilam university of medical sciences*. 26:175-85.
- 12- Garg N, Singh R, Shukla G, Capalash N, Sharma P. 2016. Immunoprotective potential of in silico predicted *Acinetobacter baumannii* outer membrane nuclease, NucAb. *International Journal of Medical Microbiology*. 306(1):1-9.
- 13- Hashemzahi R, Doosti A, Kargar M, Jaafarinia M. 2017. Gene cloning and evaluation of the *Acinetobacter baumannii* nlpD gene expression in human dermal fibroblast cells using RT-PCR. *Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences*. 21(4):359-66.
- 14- Huang W, Yao Y, Wang S, Xia Y, Yang X, Long Q, Sun W, Liu C, Li Y, Chu X, Bai H. 2016. Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Scientific reports*. 6(1):1-2.
- 15- Huang W, Wang S, Yao Y, Xia Y, Yang X, Long Q, Sun W, Liu C, Li Y, Ma Y. 2015. OmpW is a potential target for eliciting protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections. *Vaccine*. 33(36):4479-85.
- 16- Jafari-Modrek M, Ghaffarifar F, Sharifi Z, Dalimi-Asl A. 2011. Cloning and sequencing the plasmid encoding *Toxoplasma gondii* Microneme 3 protein. *KAUMS Journal (FEYZ)*. 15(3):200-6.
- 17- Khan HA, Baig FK, Mehboob R. 2017. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(5):478-82.
- 18- Lemiech-Mirowska E, Kiersnowska ZM, Michałkiewicz M, Depta A, Marczak M. 2020. Nosocomial infections as one of the most important problems of the healthcare system. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*.
- 19- Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P, Ho T, Hujer AM, Taracila MA, Bonomo RA, Spellberg B. 2013. *Acinetobacter baumannii* rOmpA vaccine dose alters immune polarization and immunodominant epitopes. *Vaccine*. 31(2):313-8.
- 20- Mollasalehi, H., Vahedipour, N., Alimi, M. (2022). 'Differentiation and specific detection of *Shigella* genus using 16S Single Specific Primer PCR (16S SSP- PCR)', *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 34(4), pp. 584-596.
- 21- Nie D, Hu Y, Chen Z, Li M, Hou Z, Luo X, Mao X, Xue X. 2020. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. *Journal of biomedical science*. 27(1):1-8.
- 22- Nocera, Francesca Paola, Anna-Rita Attili, and Luisa De Martino. 2021. *Acinetobacter baumannii*: Its clinical significance in Human and Veterinary Medicine." *Pathogens*. 10.2: 127.
- 23- Nie D, Hu Y, Chen Z, Li M, Hou Z, Luo X, Mao X, Xue X. Outer membrane protein A (OmpA) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. *Journal of biomedical science*. 2020;27(1):1-8.
- 24- Piri-Gharaghie T, Doosti A, Mirzaei SA. 2022. Identification of Antigenic Properties of *Acinetobacter baumannii* Proteins as Novel Putative Vaccine Candidates Using Reverse Vaccinology Approach. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1-23.
- 25- Pakharukova N, et al. 2015. Structural insight into archaic and alternative chaperoneusher pathways reveals a novel mechanism of pilus biogenesis. *PLoS Pathog*. 11:e1005269.
- 26- Paydarfar S, Hashemi A, Abbasi M, Bakhtiari A, Tajik F, MOSAFFA N. 2021. Investigation of preformed design *Acinetobacter Baumannii* outer

- membrane protein A peptide vaccine candidate in reaction with serum antibodies from ICU staffs members. 607-612.
- 27- Piri Gharaghie, Tohid, Seyed Ataollah Sadat Shandiz, and Sheida Beiranvand. 2020. Evaluation of silver nanoparticles effects on blaper1 gene expression for biofilm formation in isolates of antibiotic-resistant Acinetobacter Baumannii by real time PCR method." Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology) .
- 28- Piri Gharaghie T, Doosti, Abbas, Mirzaei, Seyed Abbas. 2021. Prevalence and pattern of antibiotic resistance of Acinetobacter spp. In Shahrekord medical centers. Developmental Biology. 13 (4).
- 29- Piri-Gharaghie T, Doosti A, Mirzaei SA. 2022. Fabrication and Characterization of pcDNA3. 1 (+) Location within Chitosan/Nanoparticles Complexes for Enhanced Gene Delivery. Iranian Journal of Biotechnology. 20(3):88-100.
- 30- Piri-Gharaghie T, Beiranvand S, Riahi A, Shirin NJ, Badmasti F, Mirzaie A, Elahianfar Y, Ghahari S, Ghahari S, Pasban K, Hajrasouliha S. 2022. Fabrication and characterization of thymol-loaded chitosan nanogels: Improved antibacterial and anti-biofilm activities with negligible cytotoxicity. Chemistry & Biodiversity. 19(3):e202100426.
- 31- São Pedro A, Cabral-Albuquerque E, Ferreira D, Sarmiento B. 2009. Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? Carbohydrate Polymers.76(4):501-8.
- 32- Piri-Gharaghie T, Jegargoshe-Shirin N, Saremi-Nouri S, Khademhosseini SH, Hoseinnezhad-Lazarjani E, Mousavi A, Kabiri H, Rajaei N, Riahi A, Farhadi-Biregani A, Fatehi-Ghahfarokhi S. 2022. Effects of Imipenem-containing Niosome nanoparticles against high prevalence methicillin-resistant Staphylococcus Epidermidis biofilm formed. Scientific reports. 12(1):1-3.
- 33- Singh R, Garg N, Shukla G, Capalash N, Sharma P. 2016. Immunoprotective efficacy of Acinetobacter baumannii outer membrane protein, FilF, predicted in silico as a potential vaccine candidate. Frontiers in microbiology.7:158.
- 34- Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by Acinetobacter baumannii: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiology.149:3473–3484.
- 35- Wang X, Qin LJ. 2019. A review on Acinetobacter baumannii. Journal of Acute Disease.8(1):16.
- 36- Zarinnezhad, Amineh, Mohamad Hassan Shahhoseini, and Tohid Piri Gharaghie. 2021. Evaluating the Relative Frequency of Fungal Infections in the Serum of Patients with Multiple Sclerosis and Healthy Subjects Using PCR." Biological Journal of Microorganisms. 10.37: 37-50.

Cloning and expression of the gene encoding fimbriae biogenesis Chaperone protein *Csu* from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in order to create a recombinant gene vaccine

Hosseinnezhad Lazarjani E.¹, Doosti A.² and Sharifzadeh A.³

¹ Dept. of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, I.R. of Iran.

² Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. of Iran

³ Dept. of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. of Iran

Abstract

Acinetobacter baumannii (*A. baumannii*) is a non-fermentative gram-negative coccobacillus that shows high resistance to antimicrobial compounds. Biofilm formation is an important feature of many *Acinetobacter* species that leads to high resistance to antibiotics. The present study was performed by targeting the fimbrial biogenesis protein *Csu* from carbapenem-resistant *A. baumannii* to construct a genetic construct. In this experimental study, the gene encoding the protein Chaperone biogenesis fimbriae *Csu* was amplified by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by PCR. Then, the target structure was designed by the online program PlasMapper. Then, the gene was cloned and subcloned into T and pcDNA3.1 (+) vectors, respectively. Confirmation of gene cloning was evaluated by three methods: PCR, cleavage enzymes, and sequencing. Then, 100 µl of 100 ng/ml concentration of the final recombinant vector pcDNA3.1 (+) - *csuC* was injected into the quadriceps muscle of BALB/c mice and the expression of the target gene in the quadriceps muscle of mice was examined by RT-PCR. Then the effect of time on changes in gene expression on days 2, 10, 20, 30, 40, and 60 after injection was investigated by real-time PCR, and the results of expression differences at significant levels $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$ reported. The 831 bp fragment belonging to the *csuC* gene of *A. baumannii* was successfully amplified. Also, the results showed that the final structure of pcDNA3.1 (+) - *csuC* has been formed. Observation of 831 bp band after RT-PCR in quadriceps muscle of mice in pcDNA3.1 (+) - *csuC* group compared to control group (PBS) confirms the expression of *csuC* gene in quadriceps muscle of mice. The results of the study of changes in gene expression in the target group compared to the control group showed that in the target group the expression of the target gene after 2 days showed a significant increase in expression. This increase in expression reached its highest level by day 30 after injection and the difference in expression was significant at the level of $P < 0.001$. Increased gene expression decreased significantly to $P < 0.01$ 40 days after injection. This decrease in expression continued until day 60 after injection ($P < 0.001$). The recombinant pcDNA3.1 (+) - *csuC* construct made in this study can express the *csuC* gene of *A. baumannii* in the quadriceps muscle of mice. Successful expression of the target gene can be considered as a recombinant vaccine to study immunogenicity in laboratory animals. Also, the pcDNA3.1 (+) - *csuC* construct has the potential to be considered as a gene vaccine in future research.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, *csuC*, recombinant pcDNA3.1 (+) - *csuC*, RT-PCR