

Original Article

طراحی و ساخت حامل انتحاری pDS132::ΔvirG در شیگلا فلکسنری 2a برای تولید سویه واکسنی زنده تخفیف حدت یافته شیگلا

محمد دورودیان^۱، مجتبی سعادت^۲، سید مصطفی حسینی^{۳*}

- ۱- باشگاه پژوهشگران جوان، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
- ۲- گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران.
- ۳- باشگاه پژوهشگران جوان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۲۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۸/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: سویه‌های شیگلا، باکتری‌های گرم منفی هستند که واجد توانایی ورود به درون سلول‌های غیر فاگوسیتی، از طریق ترشح پروتئین‌های افکتور (که آنتی ژن‌های تهاجمی نامیده می‌شوند (Ipa) می‌باشند. یکی از مهم‌ترین آن‌ها پروتئین virG است. واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته شیگلا، پاسخ‌های امیدوار کننده‌ای را در ایجاد ایمنی حفاظتی در مطالعات بالینی بر روی انسان از خود نشان داده‌اند. در شرایط حاضر، ساخت سویه‌های کاندید واکسنی شیگلا بر اساس استفاده از سیستم‌های تبادل آلی مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، طراحی و ساخت حامل pDS132::ΔvirG به عنوان یک ناقل انتحاری برای حذف هدفمند بخشی از ژن virG در سویه شیگلا فلکسنری 2a بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کاربردی، گونه و سروتیپ شیگلای جدا شده با استفاده از آزمایش سرم شناسی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) مورد تأیید قرار گرفت. آغازگرهای شناسایی ژن virG طراحی و سپس در حامل pGEM-5zf همسانه‌سازی و تعیین توالی گردید. بر اساس نقشه برش آنزیمی ژن virG، ۱۷۵۱ جفت باز از ژن virG با استفاده از آنزیم محدودکننده HincII حذف و ژن جهش یافته virGA به طور موفقیت‌آمیزی ایجاد گردید. حامل pGEMΔvirG با استفاده از آنزیم‌های Sall و SphI همضم گردید و سپس در حامل انتحاری (pSD132) همسانه‌سازی شد. صحت فرآیند با آزمایش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی تأیید گردید.

نتایج: سویه شیگلا فلکسنری 2a با آزمایش سرم شناسی و PCR مورد تأیید قرار گرفت. توالی ژن virG سویه بومی با سویه‌های ثبت شده در بانک ژنی به لحاظ ترادف ژنی یکسان بود. حامل انتحاری pDS132::ΔvirG با در بر داشتن ۱۴۸۴ جفت باز که از ژن virG مشتق شده است، می‌تواند به عنوان یک ناقل انتحاری اختصاصی در ایجاد تداخل در ژن virG در سویه شیگلا فلکسنری 2a به کار رود.

نتیجه گیری: استفاده از سیستم‌های انتحاری، ایجاد جهش هدفمند را تسهیل و در مقایسه با سایر روش‌های ابتدایی مانند پاساژ متوالی، روش اختصاصی و مؤثرتری می‌باشد.

کلمات کلیدی: تبادل آلی، ژن virG، شیگلا فلکسنری 2a، شیگلوز، ناقل انتحاری

مقدمه

۱/۱ میلیون نفر از مبتلایان به شیگلوز متأسفانه می‌میرند که ۶۰٪ آن‌ها را، کودکان زیر ۵ سال تشکیل می‌دهند (۴ و ۵). شیگلا پس از ورود به بدن میزبان، ناحیه راست روده و کلون را در دستگاه گوارش هدف قرار می‌دهد، این باکتری سپس قادر است تهاجم خود را به سلول‌های پوششی غیر فاگوسیتی نیز گسترش دهد، این فرآیند از طریق پروتئین‌هایی صورت می‌گیرد که در تمام سویه‌های بیماری‌زا به شدت حفاظت شده هستند. پروتئین‌های مورد نیاز توسط یک پلاسمید بزرگ ۲۱۳ کیلوبازی رمز می‌گردند که به عنوان پلاسمید تهاجمی و یا پلاسمید بیماری‌زا شناخته می‌شود (۶ و ۷). هر باکتری نهایتاً درون یک واکوئل اندوسیتوزی بلعیده شده و سپس با پاره کردن واکوئل به درون سیتوپلاسم سلول پوششی میزبان رها می‌گردد و پس از تکثیر در آنجا، به کمک پروتئین IScA (Intra Cellular Spreading A)، که به نام VirG

شیگلا فلکسنری 2a باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و بدون اسپور می‌باشد که به خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارد (۱). بیماری که توسط شیگلا ایجاد می‌شود شیگلوز نام دارد. شیگلوز یک بیماری عفونی است که قسمتی از روده بزرگ را تحت تأثیر قرار می‌دهد. شیگلوز با علائمی مانند اسهال آبی که به همراه مقادیر مختلفی از خون و مخاط، تب، حالت تهوع، استفراغ، گرفتگی و درد شکمی تشخیص داده می‌شود (۲ و ۳). در بین گونه‌های شیگلا فلکسنری 2a به عنوان یکی از سروتیپ‌های غالب و نیز عامل شیوع موارد اندمیک (endemic) شیگلوز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱).

شیگلا از نظر ژنتیکی بسیار شبیه اشریشیاکلی می‌باشد که گاهی حتی از آن به عنوان اشریشیاکلی بیماری‌زا یاد می‌شود (۳)، تقریباً ۹۹٪ عفونت‌های شیگلا در مناطق در حال توسعه رخ می‌دهد و سالانه حدود

* نویسنده مسئول: سید مصطفی حسینی، باشگاه پژوهشگران جوان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱-۸۸۶۱۷۷۱۱
Email : Geneticman2005@gmail.com

نیز شناخته می‌شود، به سمت سلول‌های پوششی مجاور حرکت می‌کند (۸-۱۰).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه کاربردی از سویه‌ها، ناقل‌ها و موارد زیر استفاده گردید. در ابتدا، باکتری شیگلا فلکسنری 2a از بیماران مبتلا به اسهال خونی در بیمارستان طالقانی، 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، هکتون، زایلوز لایزین دکربوکسیلاز، مک کانکی، ONPG، TSI، آزمون تخمیر قند آرابینوز و تولید اندول شناسایی و پس از کشت در محیط LB مایع و افزودن گلیسرول (غلظت نهایی ۱۵٪) در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. جداسازی سویه باکتریایی با آگاهی و اخذ رضایت نامه از بیماران و با هماهنگی کارکنان بخش میکروبیولوژی بیمارستان طالقانی انجام گرفت.

واکنش آنتی سرمی: سویه‌های شیگلا جدا شده از بیماران پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی، همچنین با استفاده از کیت تشخیصی منوکولونال سروتیپ گونه شیگلا فلکسنری 2a (شرکت Mast، انگلستان)، تأیید شد. برای این منظور ابتدا سویه‌های شیگلا بر روی محیط مک کانکی آگار کشت داده شدند و سپس آزمایشات شناسایی گونه با استفاده از روش آگلوتیناسیون بر روی شیشه اجرا گردید (۳۰). طراحی آغازگر: به منظور شناسایی حضور ژن virG در سویه‌های شیگلا جدا شده از بیماران مبتلا به شیکلوز، یک جفت آغازگر اختصاصی در نواحی بالا دست و پایین دست ژن مربوط، بدون جایگاه برش آنزیمی با هدف همسانه‌سازی ژن virG در حامل pGEM-5zf با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژنی طراحی و سنتز گردید (سیناکلون، ایران). توالی آغازگرهای بالادست و پایین دست عبارت بودند از:

VIRGF: 5' GGAGAATTACCTACGGTAAAGG 3'

VIRGR: 5' CACCCAAAATACCTTGGGTGTC 3'

آماده سازی DNA باکتری: پس از شناسایی اولیه سویه شیگلا فلکسنری نسبت به کشت آن در محیط LB مایع اقدام گردید و نمونه به مدت ۱۸ ساعت در گرم‌خانه شیکردار با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 virG مورد تأیید قرار گرفت.

تکثیر ژن virG و آماده سازی محصول PCR در باکتری شیگلا: DNA به دست آمده از مرحله قبل، به کمک واکنش PCR و آغازگرهای اختصاصی سروتیپ شیگلا فلکسنری 2a 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 نوکلئوتیدهای dATP، dCTP، dGTP، dTTP و ۲/۵ واحد از آنزیم DNA پلی مراز

با پروتئین VirG از سه بخش تشکیل شده است که بخش انتهایی آن میزبان وارد واکنش شده و با فعال کردن کمپلکس N-WASP (neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) (Actin-Related Proteins 2/3) در سیتوپلاسم، موجب پلیمریزه شدن اکتین‌های گلوبولی به شکل اکتین رشته‌ای (F-actin) می‌شود که نتیجه آن، گسترش آلودگی در بدن میزبان است (۱۱). باکتری‌های شیگلا که دارای نقص در ژن virG خود هستند در تمام مدل‌های حیوانی قدرت بیماری‌زایی کمتری از خود نشان داده‌اند، به طوری که در نهایت از طریق جریان گلبول‌های سفید چند هسته‌ای PMN (polymorphonuclear leukocytes)، از بدن میزبان حذف می‌گردند و بدین نحو عفونت از بین می‌رود. بنابراین، جهش در ژن بیماری‌زایی virG محور اصلی کاهش بیماری‌زایی در چندین سویه واکسن تقلیل حدت یافته می‌باشد (۱۲).

روش‌های مختلفی جهت حذف و غیر فعال نمودن ژن‌ها در باکتری‌ها گزارش شده است که برای درک بیولوژی مولکولی، فیزیولوژی، تنظیم ژنتیکی و بیماری‌زایی ارگانسیم‌ها بسیار حائز اهمیت است (۱۳-۱۶). روش‌های اولیه‌ای که برای ایجاد سویه‌های تخفیف حدت یافته به منظور تولید واکسن در باکتری و ویروس‌های بیماری‌زایی مورد استفاده قرار می‌گرفت شامل پاساژهای متوالی و جهش‌زایی با استفاده از مواد شیمیایی بود. این روش‌ها فاقد اختصاصیت بودند، به همین دلیل توسط تکنیک‌های پیشرفته‌تر مهندسی ژنتیک و نوترکیبی هومولوگ که بر مبنای حذف هدفمند ژن‌های بیماری‌زا استوارند جایگزین شدند که اغلب از این فرآیندها به عنوان «مهندسی ژنتیک معکوس» تعبیر می‌شود. یکی از روش‌های نسبتاً جدید در مهندسی ژنتیک، استفاده از ناقل‌های انتحاری به منظور ایجاد گسستگی در ژن هدف با تکیه بر رخداد تبادل آلی در باکتری‌ها می‌باشد (۲۰-۱۷). امروزه یکی از روش‌هایی که به منظور فائق آمدن بر نگرانی‌های مربوط به دست‌ورزی ژنتیکی میکروارگانسیم‌ها (genetically engineered microorganisms) GEMs مطرح می‌گردد به کارگیری سویه‌هایی است که تنها در شرایط خاص محیطی قادر به حفظ بقای خود باشند. روشی که به این منظور امروز کاربرد وسیعی در ایجاد جهش‌های اختصاصی و هدفمند پیدا کرده است به کارگیری سیستم‌های انتحاری (suicide) است (۱۷ و ۲۱).

با توجه به بیماری‌زایی و شیوع نسبتاً بالای شیگلوز در کشورهای در حال توسعه و ناموفق بودن روش‌های درمان آنتی بیوتیکی، اهمیت پیشرفت روش‌های پیشگیرانه مانند واکسیناسیون افراد و به خصوص کودکان در اولویت سازمان بهداشت جهانی (WHO) قرار دارد (۲۱). امروزه یکی از مؤثرترین نوع واکسن‌های خوراکی، تهیه سویه‌های مهاجم تخفیف حدت یافته است، که اثرات بالینی قابل قبولی را دارا می‌باشند (۲۲). در این تحقیق با توجه به اهمیت و نقش این ژن در سویه شیگلا فلکسنری 2a، به منظور ایجاد جهش جهت تولید واکسن بومی، انتخاب گردید. هدف از انجام این تحقیق ساخت پلاسمید انتحاری pDS132::ΔvirG به منظور ایجاد جهش در ژن virG با هدف ایجاد سویه زنده تخفیف حدت یافته در سویه شیگلا فلکسنری 2a جدا شده از نمونه‌های بیمارستان طالقانی

هضم آنزیمی و تأیید حذف بخشی از ژن virG: ناقل پلاسمیدی pGEM-5zf بعد از همسانه‌سازی با کاست ژنی virG، فاقد جایگاه برش برای آنزیم HincII می‌باشد. بنابراین، هضم آنزیمی حامل pGEMvirG با استفاده از آنزیم HincII (فرمنتاز، آلمان) در واکنش هضم یک گانه با ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10x، ۱۰ میکرولیتر از حامل pGEMvirG، 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 سانتی‌گراد قرار داده شد (شکل ۱). پس از اتمام زمان گرمادهی، محصول واکنش هضم بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز گردید. حامل pGEMAvirG، از روی ژل با استفاده از کیت (Gel Purification kit, QIAGEN، آمریکا) خالص‌سازی انجام و واکنش خود اتصالی مطابق مرحله قبل اجرا و در حامل اشریشیاکلی سویه DH5α تراریخت شد. پرگنه‌های مقاوم به آمپی‌سیلین (غلظت نهایی ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در محیط LB غربالگری و حذف بخشی (bp1484) از ژن virG با استفاده از واکنش PCR و تعیین توالی تأیید گردید.

جداسازی کاست ژنی از حامل pGEMAvirG: با توجه به جایگاه‌های برش آنزیمی حامل انتحاری pSD132 و ژن virG، واکنش هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم SphI و SalI اجرا گردید. در واکنش هضم دوگانه از ۵ میکرولیتر بافر 10x، ۱۰ میکرولیتر از حامل pGEMAvirG و ۲ میکرولیتر از هر آنزیم در حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر و به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفت تا انتهای چسبناک در انتهای ۳' و ۵' کاست ایجاد گردد. محصول برش خورده توسط کیت (Gel Purification kit, QIAGEN، آمریکا) پس از الکتروفورز بر روی ژل ۲ درصد خالص‌سازی گردید و برای واکنش الحاق در حامل انتحاری pSD132 آماده شد.

الحاق و تراریختی: به منظور همسانه‌سازی کاست ژنی، واکنش هضم آنزیمی دوگانه با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده SphI و SalI مطابق مرحله قبل اجرا گردید با این تفاوت که از حامل pSD132 به عنوان DNA الگو استفاده گردید. به منظور انجام واکنش الحاق، مخلوط کاست ژنی و پلاسمید برش خورده (pSD132) با نسبت ۱ به ۳ تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمادهی گردید و بلافاصله به ظرف یخ منتقل شد و سپس ۲ میکرولیتر از آنزیم لیگاز T4 و ۵ میکرولیتر از بافر 10x به آن اضافه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول واکنش الحاق در نهایت پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۸ درصد توسط کیت (PCR cleanup kit, QIAGEN، آمریکا) استخراج گردید. واکنش تراریختی مطابق مرحله قبل انجام گردید با این تفاوت که از میزبان اشریشیاکلی SM10λpir استفاده گردید. سویه SM10λpir به عنوان هدف انتخاب شد تا پلاسمید انتحاری pSD132 با منشأ R6K به میزان کافی تکثیر شود. سویه تولید شده می‌تواند به منظور القای تبادل آلی و حذف بخشی از ژن virG، در سویه وحشی شیگلا فلکسنری 2a به منظور ایجاد گسستگی (حذف) در ژن حدت زای virG به کارگیری گردد (شکل ۲).

تأیید فنوتیپی و ژنوتیپی حامل pDS132::AvirG: سویه‌های اشریشیا کلی تراریخت شده با حامل pDS132::AvirG بر روی محیط LB دارای آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل با غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به صورت چمنی کشت داده شد و سپس سویه مقاوم جداسازی و واکنش PCR

Pfu، ۵ میکرولیتر از بافر MgCl₂، 10X، با غلظت نهایی ۲/۵ میلی مولار و ۵۰ نانوگرم از DNA (با غلظت نهایی ۳۰۲/۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) تهیه شده بود. چرخه‌های PCR شامل مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و دوره سه مرحله‌ای شامل واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، تولیدسازی قطعه مورد نظر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه و ۴۵ ثانیه و در پایان، مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR پس از رنگ آمیزی در اتیديوم بروماید (با غلظت نهایی ۲۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) بر روی ژل آگارز ۱٪ به کمک مارکر مولکولی مورد تأیید قرار گرفت.

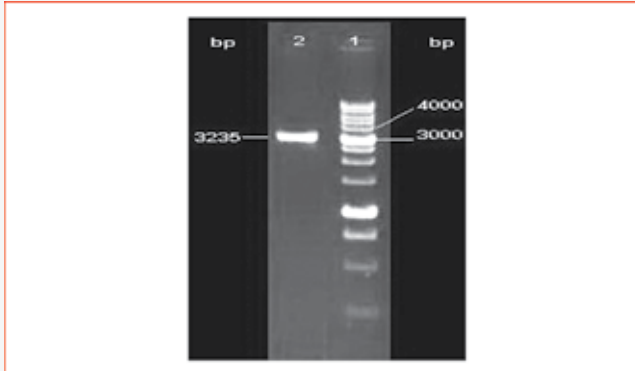
به منظور آماده‌سازی محصول DNA، PCR تکثیر شده با استفاده از کیت High Pure PCR Product (Purification Kit Roche، آلمان) خالص‌سازی انجام و جهت همسانه‌سازی برای الحاق آماده گردید.

آماده‌سازی حامل pGEM-5zf: هضم آنزیمی حامل pGEM-5zf با استفاده از آنزیم HincII (Fermentas) در واکنش هضم یک گانه با ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10x، ۱۰ میکرولیتر از حامل pGEM-5zf، 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 سانتی‌گراد قرار داده شد، تا پس از انجام برش، پلاسمید خطی برش خورده با انتهای صاف ایجاد شود.

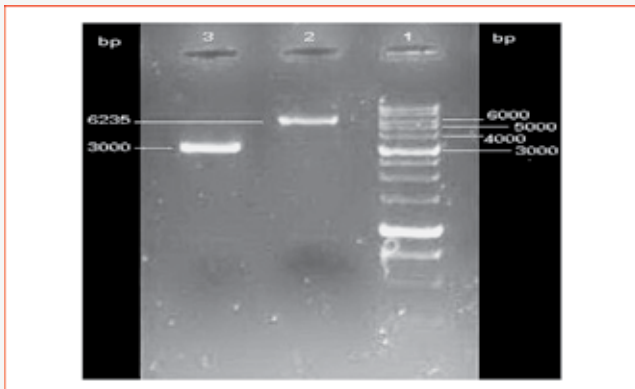
الحاق: مخلوط محصول PCR و پلاسمید برش خورده با نسبت ۱ به ۳ تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمادهی گردید و بلافاصله به ظرف یخ منتقل شد و سپس ۲ میکرولیتر از آنزیم لیگاز T4 و ۵ میکرولیتر از بافر 10x به آن اضافه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول واکنش الحاق در نهایت توسط کیت (PCR cleanup kit, QIAGEN، آمریکا) به منظور انجام تراریخت استخراج گردید.

تراریختی: پلاسمیدهای نوترکیب با روش شوک الکتریکی به یاخته مستعد *E. coli* سویه DH5α تراریخت گردید. برای این کار ابتدا سلول‌های مستعد پذیرنده الکتریکی مطابق روش (سمبروک و همکاران، ۱۹۸۹) تهیه و سپس ۳۰ میکرولیتر از این سلول‌ها با ۵ میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب، مخلوط و به مدت ۱ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد سپس با انجام شوک الکتریکی (۲/۰ کیلوولت در میلی‌ثانیه) به سلول‌های DH5α منتقل و به آن محیط SOC بدون آنتی‌بیوتیک اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. باکتری‌های رشد کرده با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و در محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به صورت چمنی کشت شدند. غربالگری: صحت همسانه‌سازی پرگنه‌های حاوی قطعه مورد نظر، به کمک PCR و در نهایت توالی‌یابی 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. پلاسمیدهای مثبت پس از خالص‌سازی توسط آغازگرهای عمومی 13M حامل و آغازگرهای طراحی شده به منظور تکثیر ژن virG به منظور تعیین توالی به تکاپوزیست فرستاده شد.

آغازگرهای عمومی 13M حامل، توالی یابی گردید، نتایج مشابهت ۱۰۰٪ ژن *virG* سویه بومی با توالی استاندارد (شماره دسترسی CP000035) در بانک ژنی را نشان داد.



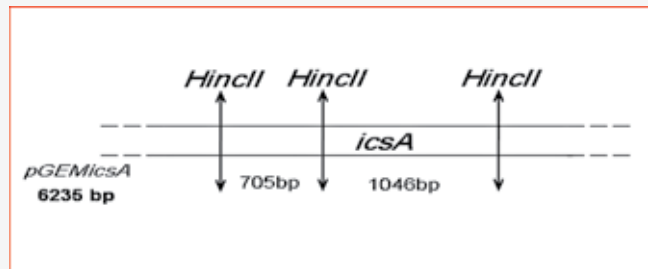
شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR تشخیص ژن *virG* بر روی ژل آگاروز (۱/۱، ۱) نشانگر وزن مولکولی DNA ۱ Kb (آلمان، فرمنتاز)، (۲) محصول PCR ژن *virG* در باکتری شماره ۱ (قطعه ۳۲۳۵ bp) با استفاده از آنزیم DNA پلی مراز Pfu، (۳) محصول PCR ژن *virG* در باکتری شماره ۱ (قطعه ۳۲۳۵ bp) با استفاده از آنزیم پلی مراز Taq.



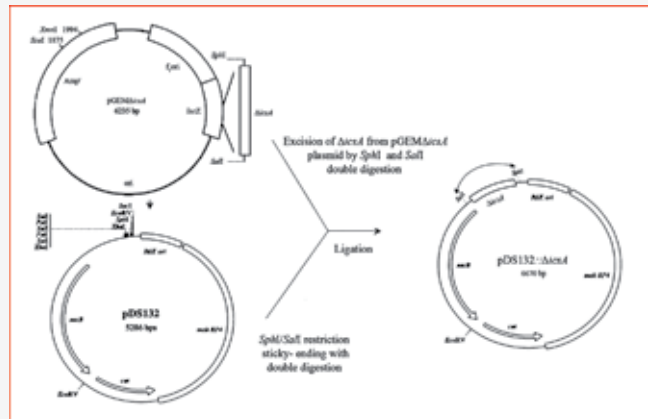
شکل ۴: الکتروفورز محصول الحاق ژن *virG* و هضم آنزیمی حامل pGEM-5zf بر روی ژل آگاروز (۱/۱، ۱) نشانگر وزن مولکولی DNA ۱Kb (آلمان، فرمنتاز)، (۲) محصول واکنش الحاق ژن *virG* به حامل pGEM-5zf، (۳) برش آنزیمی حامل pGEM-5zf با استفاده از آنزیم محدود کننده *HincII*، قطعه ۳۰۰۰ bp نشان دهنده خطی شدن حامل پیش از انجام واکنش الحاق می‌باشد.

در ادامه به منظور ایجاد حذف بخشی از ژن *virG*، آنالیز رایانه‌ای که با استفاده از نرم افزار DNASIS انجام گرفت نشان داد که این ژن در ۳ جایگاه دارای سایت برشی برای آنزیم *HincII* می‌باشد. بعد از برش آنزیمی و انجام واکنش خود اتصالی (self ligation) قطعه ۴۴۸۴ جفت بازی (pGEMΔ*virG*) بر روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۶، ستون ۳). پلاسمید نوترکیب pGEMΔ*virG* با استفاده از دو آنزیم *SphI* و *SalI* هضم گردید و قطعه مورد نظر (۱۴۸۴ bp) بر روی ژل آگارز ۱/۸ درصد مشاهده و سپس به منظور همسانه‌سازی در ناقل pSD132 خالص‌سازی گردید (شکل ۶، ستون ۲).

تعیین توالی به منظور تأیید صحت فرآیندهای فوق انجام گردید.



شکل ۱: نقشه جایگاه‌های برشی ژن *virG* با استفاده از آنزیم محدود کننده *HincII* ژن *virG* دارای سه سایت برشی برای آنزیم محدود کننده *HincII* می‌باشد، به طوری که پس از برش با این آنزیم سه قطعه ۷۰۵، ۱۰۴۶ و ۱۴۸۴ جفت بازی (۱۴۸۴=۱۷۵۱-۳۲۳۵) به ترتیب، ایجاد می‌گردد.



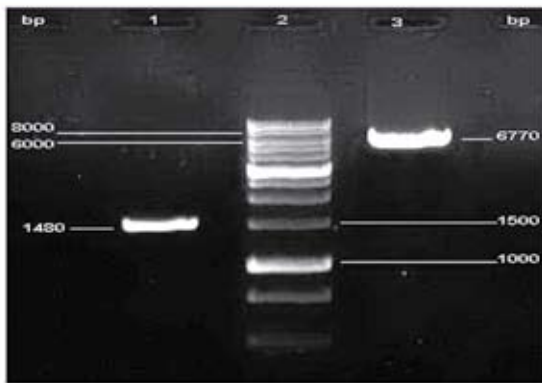
شکل ۲: خلاصه مراحل ایجاد ناقل pSD132Δ*virG* پس از همسانه‌سازی و حذف ۱۷۵۱ جفت باز از ژن *virG*، قطعه ۱۴۸۴ جفت بازی باقی‌مانده از ژن *virG* در ناقل انتحاری pSD132 مجدداً همسانه‌سازی گردید.

نتایج

نتایج واکنش‌های بیوشیمیایی و آنتی سرمی گونه و سروتیپ شیگلا فلکسنری 2a را، در نمونه‌های دریافتی از بیمارستان طالقانی، تأیید نمود. حضور ژن *virG* از طریق واکنش PCR، تکثیر و بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد مطالعه قرار گرفت، همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف ما هم‌خوانی داشت (ستون ۲ و ۳، قطعه 3235 bp).

جهت خطی نمودن حامل pGEM-5zf به منظور الحاق ژن *virG*، از واکنش هضم آنزیمی توسط *HincII* استفاده شد، در اثر برش آنزیمی حامل pGEM-5zf قطعه ۳۰۰۰ جفت بازی با انتهای صاف (Blunt) به دست آمد (شکل ۴، ستون ۳). همان طور که در شکل ۴ مشاهده می‌گردد، پس از الحاق ژن *virG* در حامل pGEM-5zf، اندازه قطعه مشاهده شده بر روی ژل آگارز ۱٪ مطابق انتظار بود (ستون ۲، قطعه 6235 bp). تشکیل قطعه ۶۲۳۵ جفت بازی صحت همسانه‌سازی ساختار pGEM*virG* را نشان داد (شکل ۵، ستون ۲). به منظور تأیید بیشتر همسانه pGEM*virG* با

سپس توالی یابی با دو آغازگر طراحی شده برای نواحی مجاور ناحیه حذف شده در ژن *virG* انجام گردید، مقایسه ناحیه توالی یابی شده با اطلاعات موجود در بانک ژنی نشان داد که ۱۷۵۱ جفت باز از ژن *virG* از سویه وحشی شیگلا فلکسنری 2a در پلاسمید نو ترکیب pSD132Δ*virG* دچار گسستگی (حذف) شده است.



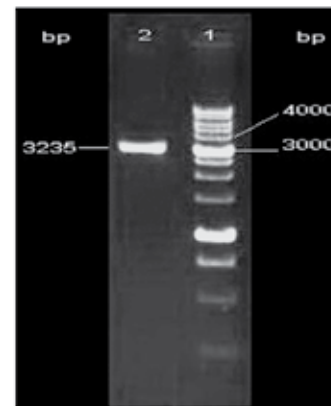
شکل ۷: الکتروفورز محصول همسانه سازی ژن Δ*virG* در ناقل انتحاری pSD132 و محصول PCR تشخیص ژن جهش یافته Δ*virG* بر روی ناقل pSD132Δ*virG* ژل آگاروز ۱/۸٪ (۱) نشانگر وزن مولکولی ۱ Kb (آلمان، فرمنتاز)، (۲) قطعه ۶۶۷۰ جفت بازی نشان دهنده صحت همسانه سازی قطعه ۱۴۸۴ جفت بازی ژن Δ*virG* می باشد، (۳) محصول PCR تشخیص ژن جهش یافته Δ*virG* در ناقل انتحاری pSD132Δ*virG* (قطعه ۱۴۸۴ bp).

بحث

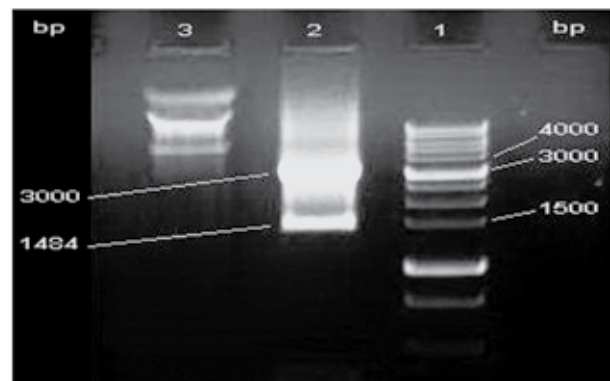
تاکنون تلاش های بسیار زیادی جهت تولید یک واکنش ایمن و مؤثر علیه عامل بیماری اسهال خونی در جهان صورت گرفته است، ولی هیچ کدام از آن ها به دلایلی مانند: ایمن نبودن در کودکان، عدم تحریک مناسب ایمنی مخاطی، پیچیده بودن روند تولید واکنش و گران بودن، مجوز استفاده در حجم وسیع و عمومی را دریافت نکرده اند و گاهی مصرف آن ها به یک کشور خاص و در گروه سنی خاصی محدود شده است. یکی از مهم ترین راهکارهای تولید واکنش علیه شیگلوز تولید واکنش های زنده مهاجم و تخفیف حدت یافته می باشد زیرا این واکنش ها علاوه بر داشتن مصرف خوراکی، توانایی بالایی را در تحریک سیستم ایمنی مخاطی و فعال کردن شدید سیستم ایمنی دارا هستند (۲۳-۲۱).

میتزرت 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 واکنشی پس از ۳۲ مرتبه کشت متوالی در محیط نوترینت آگار جداسازی و از نظر ایجاد ورم ملتحمه در چشم کوچک هندی (تست Sereny) منفی گزارش گردید (۲۴).

ونکاتسن و همکاران در سال ۱۹۹۰ سویه کاندید واکنشی T32-ISTRATI را از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی ارزیابی نمودند. ارزیابی ها حذف سه لکوس *invA*، *virG* و *IpaABCD* را در پلاسمید مهاجمی شیگلا نشان داد. همچنین کاندید واکنشی شیگلا فلکسنری 2a وابسته



شکل ۵: الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نو ترکیب pGEM*virG* بر روی ژل آگاروز ۱/۸٪ (۱) نشانگر وزن مولکولی DNA ۱ Kb (آلمان، فرمنتاز)، (۲) محصول PCR ژن *virG* با استفاده از آغازگر های شناسایی ژن *virG*، تشکیل قطعه ۳۲۳۵ bp صحت همسانه سازی را تأیید نمود.



شکل ۶: الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pGEMΔ*virG* با آنزیم های محدود کننده *SphI* و *SalI* و محصول واکنش خود اتصالی حامل pGEM*virG* پس از برش آنزیمی با آنزیم محدود کننده *HincII* بر روی ژل آگاروز ۱/۲٪ (۱) نشانگر وزن مولکولی ۱ Kb (آلمان، فرمنتاز)، (۲) برش پلاسمید نو ترکیب pGEMΔ*virG* با آنزیم های *SphI* و *SalI*، محصول ۱۴۸۴ جفت بازی صحت هضم آنزیمی قطعه Δ*virG* از پلاسمید نو ترکیب pGEM*virG* را نشان می دهد، (۳) محصول واکنش خود اتصالی پلاسمید pGEMΔ*virG* پس از برش آنزیمی با آنزیم *HincII*، قطعه ۴۴۸۴ جفت بازی حذف ۱۷۵۱ جفت باز از ژن *virG* را تأیید می نماید.

همان طور که در شکل ۷ نشان داده شده است، حضور قطعه ۶۶۷۰ جفت بازی، صحت الحاق ژن جهش یافته (Δ*virG*) را در پلاسمید نو ترکیب pSD132 نشان می دهد (ستون ۳، قطعه 6670 bp). در ادامه به منظور تأیید حضور سازه ژنی Δ*virG* در ناقل انتحاری نو ترکیب pSD132Δ*virG* واکنش PCR اجرا گردید که نتیجه آن حضور قطعه ۱۴۸۴ جفت بازی از سازه ژنی Δ*virG* را تأیید نمود (شکل ۷، ستون ۱)،



قابل ارزیابی و سنجش باشد.

در تحقیقاتی که در آن ایجاد جهش با تکیه بر روش‌های تبادل آلی انجام پذیرفته است از وکتورهای خودکشان بهره گرفته شده است اگر چه این تکنیک در بسیاری از باکتری‌ها کارایی دارد اما بسیار پیچیده می‌باشد. عدم تکثیر حامل خودکشان در برخی از سویه‌ها، فرکانس پایین نوترکیبی در حالت double crossover و جداسازی سویه‌های جهش یافته مورد نظر که سهم بسیار کمی از سویه‌های تراریخت شده را تشکیل می‌دهند از مشکلات این روش‌ها می‌باشد. اما به منظور حل کردن مشکل فوق در برخی از تحقیقات از نشانگرهای شمارشگر انتخاب شونده (Counterselectable) مانند ژن‌های *thyA* و *SacB* *apsL* به کار گرفته شده است (۱۳، ۲۰ و ۲۸). در تحقیق حاضر با توجه به مزایای ناقل pSD132، به منظور ساخت سازه pSD132Δ*virG* مورد استفاده قرار گرفت. این پلاسمید به دلیل حضور ژن گزارشگر *sacB*، وجود ناحیه *mob* (از پلاس مید RP4) و داشتن منشأ همانندسازی از پلاسمید R6K کاندید مناسبی به عنوان یک ناقل انتخابی در ایجاد حذف ژنی با تکیه بر پدیده تبادل آلی می‌باشد. معایب استفاده از این تکنیک را می‌توان در استفاده از پلاسمیدهای متعدد، هزینه بالا و زمان زیاد، انتخاب قطعه با طول بالا با ناحیه هدف و نیز احتمال از بین رفتن پلاسمید خودکشان در میزبان مورد نظر بر شمرد. اما با توجه به حذف هدفمند ژن مورد نظر در سویه وحشی نسبت به روش‌های اولیه تری مانند پاساژ متوالی برتری قابل توجهی به دلیل اختصاصیت در جایگاه حذف ژن مورد نظر داراست. امروزه در دوران پس از ژنومیکس، با مشخص شدن توالی ژنومی موجودات پروکاریوت مانند اشرشیاکلی، سالمونلا و شیگلا و غیره استفاده از این تکنیک‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (۳۲ و ۳۳).

نتیجه گیری

امروزه کارایی استفاده از پلاسمیدهای انتخابی علیرغم معایب اشاره شده در بسیاری از باکتری‌های حدت‌زا مانند شیگلا اثبات شده است. در مجموع، سازه pSD132Δ*virG* با داشتن حدوداً ۶۰۰ جفت باز توالی مشابه با نواحی از ژن هدف (*virG*) در هر طرف خود، یک پلاسمید انتخابی مناسب برای ایجاد جهش در پلاسمید مهاجمی گونه‌های شیگلا می‌باشد. از آنجایی که این پلاسمید به دلیل عدم جای‌گذاری توالی‌های نشانه‌ای (scars sequence) از خود در ژنوم باکتری، می‌تواند از آن به منظور ایجاد جهش‌های ترکیبی نیز استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دکتر آل‌بویه و خانم نوچی از بیمارستان آیت الله طالقانی، مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد به خاطر همکاری صمیمانه تشکر می‌گردد.

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، برگشت‌پذیری به نوع وحشی و ناپایداری ژنتیکی را دارد، بنابراین به منظور ایجاد جهش اختصاصی و هدفمند در باکتری مناسب نمی‌باشد (۲۵).

امروزه با پیشرفت روش‌های مهندسی ژنتیک تکنیک‌های مختلفی به منظور ایجاد جهش و گسستگی در ژن‌ها استفاده می‌گردد که بیشترین آن‌ها بر پایه غیرفعال کردن ژن‌ها از طریق دخول کاست ژنی و یا حذف ژن قرار گرفته است. یکی از مهم‌ترین روش‌ها، استفاده از پلاسمیدهای انتخابی می‌باشد. یوشیکاوا و همکاران در سال ۱۹۹۵ با ایجاد دو جهش در ژن‌های *virG* و *thyA* توانستند سویه تخفیف حدت یافته شیگلا فلکسنری a2 را با استفاده از ترانسپوزون Tn10 و فاژ P1 ایجاد کنند. عدم ایجاد التهاب و حفاظت در برابر شیگلا از نتایج آن در مدل حیوانی کوچک هندی بود (۲۶). سویه کاندید وا کسنی (CVD1203 (*virG*, Δ*aroA*) توسط نورجیا و همکاران در سال ۱۹۹۴ با استفاده از پلاسمیدهای خودکشان pFJ201/pKTN701 ساخته شد (۲۹). نتایج بالینی این سویه واکسنی در کوچک هندی و انسان در دوز متوسط (در حدود ۱۰۶ CFU) نشان از تحمل‌پذیری بالای آن داشت اما در دوزهای بالاتر (در حدود ۱۰۸ تا ۱۰۹ CFU) بخشی از دریافت‌کنندگان به سویه واکسنی واکنش منفی نشان دادند (۱۶). بنابراین، ایجاد تخفیف حدت بیشتر از طریق غیرفعال نمودن مسیرهای بیوسنتزی، متابولیکی و نیز توکسینی مورد توجه قرار گرفت. هم چنین علاوه بر CVD1203، CVD1204 (*guaBA*Δ)، CVD1205 (*virG*, Δ*guaBA*Δ)، CVD1207 (Δ*set*, Δ*sen*، Δ*guaBA*, Δ*virG*) و CVD1208 (*set*, Δ*sen*, Δ*guaBA*)، بر پایه استفاده از پلاسمیدهای خودکشان و پدیده تبادل آلی طراحی و ساخته شد. نتایج بالینی سویه‌های تولید شده نشان دادند که حذف و غیرفعال نمودن این ژن‌ها تحمل‌پذیری و ایمنی‌زایی بالایی را در انسان سبب می‌گردد (۱۶). ونکاتسن و همکاران در سال ۲۰۰۲ با ایجاد جهش در دو ژن *virG* و *stxA* سویه کاندید واکسنی WRSd1 را ایجاد نمودند. در این تحقیق از پلاسمید خودکشان pCVD442 و محیط حاوی کلرات پتاسیم به منظور حذف ژن‌های *virG* و *stx* استفاده گردید (۱۴).

سدورژ و همکاران در سال ۲۰۰۸ سویه کاندید واکسنی SC599، را از سویه شیگلا فلکسنری 2a حامل جهش حذفی در ژن‌های *virG*، *entF*، (ژن مسئول بیوسنتز انتروکلین)، *fepA* (گیرنده دریافت‌کننده انتروکلین) و *fes* (مسئول رهاسازی از Fe^{3+} از انتروکلین) و *stx* ساختند. در این تحقیق از پلاسمید از خود بین برنده 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 (۲۷-۱۴).

مهندسی ژنتیک معکوس روش قدرتمندی برای شناسایی کارکرد ژن‌ها و ایجاد جهش در آن‌ها می‌باشد به شرطی که با ایجاد جهش و یا غیرفعال‌سازی ژن مورد نظر، تأثیرات آن بر روی میکروارگانیسم

References

1. Kotloff K, Winickoff J, Ivanoff B, Clemens J, Swerdlow D, Sansonetti P, et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull. World Health Organ.* 1999;77:651–666.
2. Banish L, Sims R, Sack D, Montali R, Phillips L, Bush M. Prevalence of shigellosis and other enteric pathogens in a zoologic collection of primates. *J Am Vet Med Assoc.* 1993;203:126–132.
3. Lan R, Alles M, Donohoe K, Martinez M, Reeves P. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and shigella spp. *Infect Immun.* 2004;72:5080–5088.
4. Girard M, Steele D, Chaignat C, Kieny M. A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine.* 2006;24:2732–2750.
5. Bennish M. Potentially lethal complications of shigellosis. *Rev Infect Dis.* 1991;13:319–324.
6. Venkatesan M, Buysse J, Kopecko D. Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from *Shigella flexneri*. *Proc Natl Acad USA.* 1988;85:9317–9321.
7. Venkatesan M, Goldberg M. Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. *Infect Immun.* 2001;69:3271–3285.
8. Bernardini M, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-Randon M, Sansonetti P. Identification of virG, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:3867–3871.
9. Lett M, Sasakawa C, Okada N, Sakai T. virG, a plasmid-coded virulence gene of *Shigella flexneri*: identification of the VirG protein and determination of the complete coding sequence. *J Bacteriol.* 1989;171:353–359.
10. Suzuki T, Sasakawa C. Molecular basis of intracellular spreading of *Shigella*. *Infect Immun.* 2001;69:5959–5966.
11. Toshihiko S, Shinsuke S, Chihiro S. Functional Analysis of *Shigella* VirG Domains Essential for Interaction with Vinculin and Actin-based Motility. *J Bio Chem.* 1996;271:21878–21885.
12. Ranallo R, Barnoy S, Thakkar S, Urlick T, Venkatesan M. Developing live *Shigella* vaccines using lambda red recombination. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;47:462–469.
13. Reytrat J, Pelicic V, Gicquel B, Rappuoli R. Counterselectable Markers: Untapped Tools for Bacterial Genetics and Pathogenesis. *Infect Immun.* 1998;66:4011–4017.
14. Venkatesan M, Hartman A, Newland J, Ivanova V, Hale T, McDonough M, et al. construction, Characterization, and animal Testing of WRSd1, a *Shigella Dysenteriae* 1 Vaccine. *Infect Immun.* 2002;70:2950–2958.
15. Alexander W, Hartman A, Oaks E, Venkatesan M. Construction and characterization of virG (virG)-deleted *E.coli* K12- *S.flexneri* hybrid vaccine strains. *Vaccine.* 1996;14:1053–1061.
16. Kotloff K, Pasetti M, Barry E, Nataro J, Wasserman S, Sztein M, et al. Deletion in the *Shigella* enterotoxin genes further attenuates *Shigella flexneri* 2a bearing guanine auxotrophy in a phase 1 trial of CVD 1204 and CVD 1208. *J Infect Dis.* 2004;190:1745–1754.
17. Court D, Sawitzke J, Thomason L. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu Rev Genet.* 2002;36:361–388.
18. Philippe N, Alcaraz J, Coursange E, Geiselman J, Schneide D. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. *Plasmid.* 2004;51:246–255.
19. Bej A, Perlin M, Atlas R. Model Suicide Vector for Containment of Genetically Engineered Microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 2000;97:6640–6645.
20. Zhang Y, Buchholz F, Muylers J, Stewart A. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet.* 1998;20:123–128.
21. Jennison A, Verma N. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28:43–58.
22. Girard M, Steele D, Chaignat C, Kieny M. A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine.* 2006;24:2732–2750.
23. Fries LF, Montemarano AD, Mallet CP, Taylor DN, Hale T, Lowell G. Safety and immunogenicity of a proteosome-*Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide vaccine administered intranasally to healthy adults. *Infect Immun.* 2001;69:4545–4553.
24. Meitert T, Pencu E, Ciudin L, Tonciu M. Vaccine strain *Sh. flexneri* T32-ISTRATI. Studies in animals and volunteers. Anti-dysentery immunoprophylaxis and immunotherapy by live vaccine VADIZEN (*Sh. flexneri* T32-ISTRATI). *Arch Roum Pathol Exp Microbiol.* 1984;43:251–278.
25. Venkatesan M, Fernandez-Prada C, Buysse J, Formal S, Hale T. Virulence phenotype and genetic characteristics of the T32-ISTRATI *Shigella flexneri* 2a vaccine strain. *Vaccine.* 1991;9:358–363.
26. Yoshikawa M, Sasakawa Ch, Okada N, Takasaka M, Nakayama M, Yoshikawat Y et al. Construction and evaluation of a virG thyA double mutant of *Shigella flexneri* 2a as a candidate live attenuated oral vaccine. *Vaccine.* 1995;13:1436–1440.
27. Sadorge Ch, Ndiaye A, Beveridge N, Frazer S, Giemza R, Jolly N et al. Phase 1 clinical trial of live attenuated *Shigella dysenteriae* type-1 ΔvirG Δent Δfep ΔstxA: HgR oral vaccine SC599 in healthy human adult volunteers. *Vaccine.* 2008;26:978–987.
28. Dean D. A plasmid cloning vector for the direct selection of strains carrying re-combinant plasmids. *Gene.* 1981;15:99–102.
29. Noriega F, Wang J, Losonsky G, Maneval D, Hone D, Levin M. Construction and Characterization of Attenuated AaroA AvirG *Shigella flexneri* 2a Strain CVD 1203, a Prototype Live Oral Vaccine. *Infect Immun.* 1994;62:5168–5172.
30. Talukder K, Dutta D, Safa A, Ansaruzzaman M, Hassan



H, Alam K et al. Altering trends in the dominance of *Shigella flexneri* serotypes and emergence of serologically atypical *S. flexneri* strains in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3757–3759.

31. Reyrat JM, Pelicic V, Gicquel B and Rappuoli R. Counterselectable Markers Untapped Tools for Bacterial Genetics and Pathogenesis. *Infect Immun.* 1998;66:4011–4017.

32. Ranallo RT, Thakkar S, Chen Q, Venkatesan MM.

Immunogenicity and characterization of WRSF2G11: a second generation live attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain. *Vaccine.* 2007;25:2269–2278.

33. Zaman K, Dang DA, Victor JC, Shin S, Yunus M, Dallas MJ, et al. Efficacy of pentavalent rotavirus vaccine against severe rotavirus gastroenteritis in infants in developing countries in Asia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2010;37:615–623.

Original Article

Engineering and Construction of pDS132::ΔvirG as Suicide Vector for Targeted Gene Deletion of virG From *Shigella flexneri* 2a in Order to Generation a Live Attenuated *Shigella* Vaccine

Doroudian M¹, Saadati M², Hosseini SM^{3*}

1- Young Researchers club, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Biology, Imam Hosseini University, Tehran, Iran.

3- Young Researchers Club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objective: *Shigella* are Gram negative bacteria capable of inducing their entry into non-phagocytic cells via secretion of various effector proteins called invasion plasmid antigens (Ipas). The most important of Ipas is VirG protein. Live attenuated *Shigella* vaccines have indicated promise in inducing protective immune responses in human clinical trials. In current situation, constructions of *Shigella* vaccine candidate strains based on classical allelic exchange systems are considered. The aim of this research was to engineered and construction of pDS132::ΔvirG as a suicide plasmid for targeted deletion regions of *virG* gene by using allele exchange method in *Shigella flexneri* 2a.

Materials & Methods: In this applied study, species and serotype of *shigella* was confirmed by using serological and Polymerase Chain Reaction (PCR) tests. Detection primers of *virG* gene were designed and cloned to pGEM-5zf vector and finally, sequencing was done. According to virG restriction enzyme map, 1751 bp of *virG* gene was removed by using of *HincII* restriction enzyme and the ΔvirG was successfully constructed. The pGEMΔvirG vector was digested by use of *SphI* and *Sall* enzymes and then cloned to pSD132 as suicide vector. Precision of process were verified through phenotype and genotype experiment.

Results: The *Shigella flexneri* type 2a strain was verified by serological and PCR tests. Sequence of the *virG* gene in native strain was sequentially identical with the strains submitted in the Gene-Bank database. Since the pDS132::ΔvirG contains 1484 bp which derived from *virG* gene, therefore, it can be utilized for the interference in *virG* gene as specific suicide vector in *shigella flexneri* 2a.

Conclusion: Application of suicide systems facilitated mutant construction in more specific and effective method in comparison with the other early techniques such as serial passage.

Keywords: Allelic exchange, *virG*, *Shigella flexneri* 2a, Shigellosis, Suicide vector.

* **Corresponding author:** Hosseini Sayed Mostafa, Young Researchers Club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Tel: +98 21 88617711
E-mail: Geneticman2005@gmail.com