Original Article

طراحی و ساخت حامل انتحاری pDS132::ΔvirG به منظور حذف ژن virG در *شیگلا فلکسنری* 2a برای تولید سویه واکسنی زنده تخفیف حدت یافته شیگلا

محمد دورودیان[۱]، مجتبی سعادتی[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 دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۰۸/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۲۷

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 (Ipas) 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 آللی 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 پلیمراز (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 virGΔ به طور موفقیت‌آمیزی ایجاد گردید. حامل pGEMΔvirG با استفاده از آنزیم‌های SphI و SalI هضم 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 آللی، ژن virG، *شیگلا فلکسنری* 2a، شیگلوز، ناقل انتحاری**

مقدمه

شیگلا فلکسنری 2a باکتری گرم منفی، بی هوازی 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 آبکی 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 بیماری زا یاد می‌شود (۳)، تقریباً ۹۹% عفونت‌های شیگلا در مناطق در حال توسعه رخ می‌دهد و سالانه حدود 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 فرایند از طریق پروتئین‌هایی صورت می‌گیرد که در تمام سویه‌های بیماری زا به شدت حفاظت شده هستند. پروتئین‌های مورد نیاز توسط یک پلاسمید بزرگ ۲۱۳ کیلوبازی رمز می‌گردند که به عنوان پلاسمید تهاجمی و یا پلاسمید بیماری زا 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

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

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.1.4.8.5]

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

پروتئین VirG از سه بخش تشکیل شده است که بخش انتهایی آن با پروتئین N-WASP (neural Wiskott–Aldrich syndrome protein) میزبان وارد واکنش شده و با فعال کردن کمپلکس Arp 2/3 (Actin-Related Proteins 2/3) در سیتوپلاسم، موجب پلیمریزه شدن اکتین های 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 بیماری زایی 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 ارگانیسم‌ها بسیار حائز اهمیت است (۱۶-۱۳). 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 آللی در باکتری‌ها می‌باشد (۲۰-۱۷). امروزه یکی از روش‌هایی که به منظور فائق آمدن بر نگرانی‌های مربوط به دستورزی ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها GEMs (genetically engineered microorganisms) 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 بود.

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 سوآپ های استریل در محیط سالمونلا ـ 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، 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 منوکلونال 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 شیگلوز 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 پایین‌دست 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 dTTP، dGTP، dCTP، dATP و ۲/۵ واحد از آنزیم DNA پلی مراز

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.1.4.8.5]

Pfu، ۵ میکرولیتر از بافر $MgCl_2$ ،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، طویل‌سازی 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 اتیدیوم 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 T4و 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 کیلو ولت در میلی ثانیه) به سلول‌های DH5α منتقل و به آن محیط SOC بدون آنتی بیوتیک 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 آنتی بیوتیک 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 توالی یابی تأیید گردیدند. برای انجام این کار، پلاسمید باکتری با استفاده از کیت AccuPrep (Plasmid Extraction BioNEER، Kit، 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.

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 pGEMΔvirG، از روی ژل با استفاده از کیت (QIAGEN، Gel Purification kit، 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.

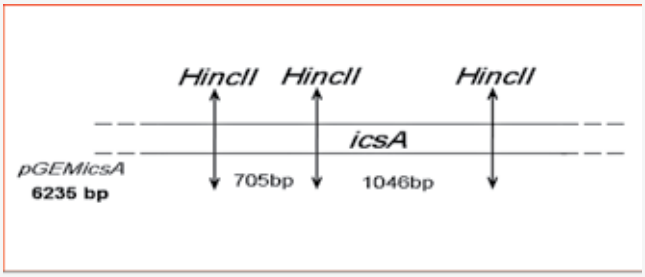
جداسازی کاست ژنی از حامل pGEMΔvirG: با توجه به جایگاه‌های برش آنزیمی حامل انتحاری pSD132 و ژن virG، واکنش هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم SalI و SphI اجرا گردید. در واکنش هضم دوگانه از ۵ میکرولیتر بافر 10x، ۱۰ میکرولیتر از حامل pGEMΔvirG و ۲ میکرولیتر از هر آنزیم در حجم واکنش ۵۰ میکرولیتر و به مدت 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 (QIAGEN، Gel Purification kit، 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 SalI و SphI 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 (QIAGEN، PCR cleanup kit، آمریکا) استخراج گردید. واکنش تراریختی مطابق مرحله قبل انجام گردید با این تفاوت که از میزبان اشرشیاکلی SM10 λpir استفاده گردید. سویه SM10 λpir 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 آللی 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).

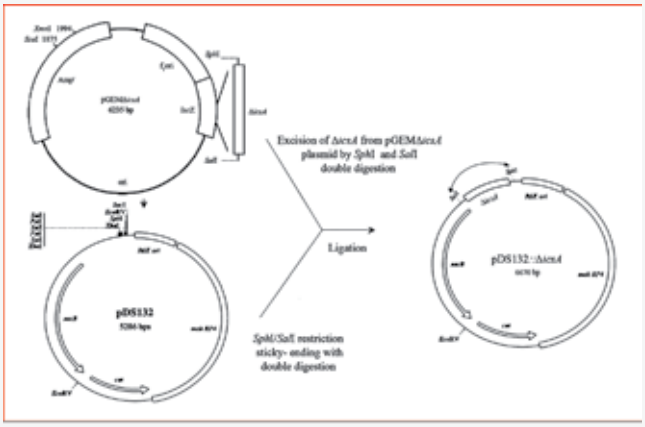
تأیید فنوتیپی و ژنوتیپی حامل pDS132::ΔvirG: سویه‌های اشرشیا کلی تراریخت شده با حامل pDS132::ΔvirG بر روی محیط LB دارای آنتی بیوتیک کلرامفنیکل با غلظت ۱۲/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر به صورت چمنی کشت داده شد و سپس سویه مقاوم جداسازی و واکنش PCR و

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.1.4.8.5]

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.

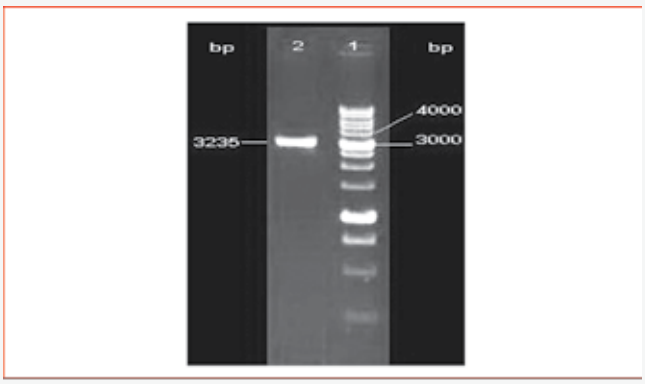


شکل ۲: خلاصه مراحل ایجاد ناقل pSD132Δ*virG* پس از همسانه‌سازی و حذف ۱۷۵۱ جفت باز از ژن *virG*، قطعه ۱۴۸۴ جفت بازی باقی‌مانده از ژن *virG* در ناقل انتحاری pSD132 مجدداً همسانه‌سازی گردید.

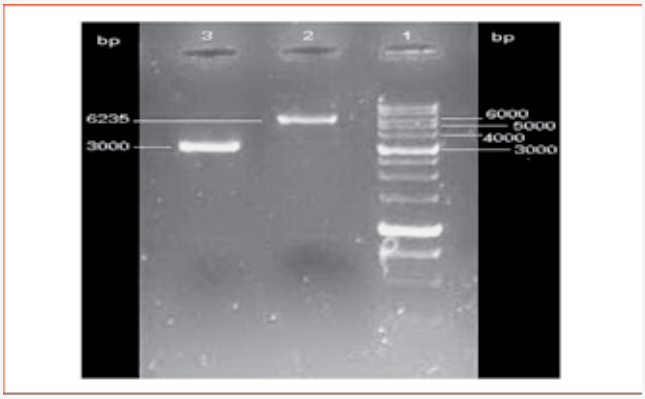
نتایج

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 آگاروز 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 HincΠ 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 آگاروز ۱% مطابق انتظار بود (ستون ۲، قطعه 6235bp). تشکیل قطعه ۶۲۳۵ جفت بازی صحت همسانه‌سازی ساختار pGEMvirG را نشان داد (شکل ۵، ستون ۲). به منظور تأیید بیشتر همسانه pGEMvirG با آغازگرهای عمومی 13M حامل، توالی‌یابی گردید، نتایج مشابهت ۱۰۰% ژن virG سویه بومی با توالی استاندارد (شماره دسترسی CP000035) در بانک ژنی را نشان داد.



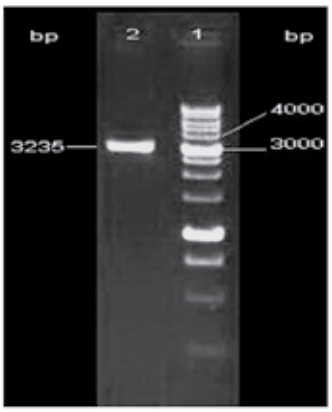
شکل ۳: الکتروفورز محصول PCR تشخیص ژن *virG* بر روی ژل آگاروز ۱٪ ، ۱) نشانگر وزن مولکولی Kb DNA ۱ (آلمان، فرمنتاز)، ۲) محصول PCR ژن *virG* در باکتری شماره ۱ (قطعه bp ۳۲۳۵) با استفاده از آنزیم DNA پلی مراز Pfu، ۳) محصول PCR ژن *virG* در باکتری شماره ۱ (قطعه bp ۳۲۳۵) با استفاده از آنزیم DNA پلی مراز Taq.



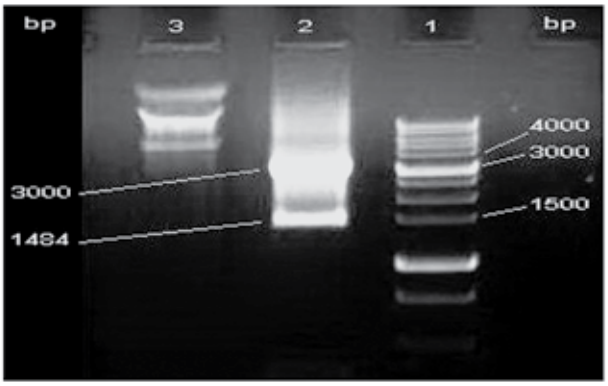
شکل ۴: الکتروفورز محصول الحاق ژن *virG* و هضم آنزیمی حامل pGEM-5zf بر روی ژل آگاروز ۱/۸٪ ، ۱) نشانگر وزن مولکولی Kb DNA ۱ (آلمان، فرمنتاز)، ۲) محصول واکنش الحاق ژن *virG* به حامل pGEM-5zf، ۳) برش آنزیمی حامل pGEM-5zf با استفاده از آنزیم محدود کننده *HincΠ*. قطعه bp ۳۰۰۰ نشان دهنده خطی شدن حامل پیش از 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 HincΠ می‌باشد. بعد از برش آنزیمی و انجام واکنش خود اتصالی (self ligation) قطعه ۴۴۸۴ جفت بازی (pGEMΔvirG) بر روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۶، ستون ۳). پلاسمید نوترکیب pGEMΔvirG با استفاده از دو آنزیم SphI و SalI هضم گردید و قطعه مورد نظر (1484 bp) بر روی ژل آگارز ۱/۸ درصد مشاهده و سپس به منظور همسانه‌سازی در ناقل pSD132 خالص‌سازی گردید (شکل ۶، ستون ۲).

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.1.4.8.5]



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



شکل ۶: الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pGEMΔ*virG*با آنزیم‌های محدودکننده *SphI* و *SalI* و محصول واکنش خود اتصالی حامل pGEM*virG* پس از برش آنزیمی با آنزیم محدود کننده *HincII* بر روی ژل آگاروز ۲٪ ۱) نشانگر وزن مولکولی Kb ۱DNA (آلمان، فرمنتاز)، ۲) برش پلاسمید نوترکیب pGEMΔ*virG* با آنزیم‌های *SphI* و SalI، محصول ۱۴۸۴ جفت بازی صحت هضم آنزیمی قطعه Δ*virG* از پلاسمید نوترکیبpGEM*virG* را نشان می‌دهد، 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 تایید می‌نماید.

همان طور که در شکل ۷ نشان داده شده است، حضور قطعه ۶۶۷۰ جفت بازی، صحت الحاق ژن جهش یافته (ΔvirG) را در پلاسمید نوترکیب pSD132 نشان می‌دهد (ستون ۳، قطعه 6670 bp). در ادامه به منظور تأیید حضور سازه ژنی ΔvirG در ناقل انتحاری نوترکیب pSD132ΔvirG واکنش PCR اجرا گردید که نتیجه آن حضور قطعه ۱۴۸۴ جفت بازی از سازه ژنی ΔvirG را تأیید نمود (شکل ۷، ستون ۱)، سپس توالی‌یابی با دو آغازگر طراحی شده برای نواحی مجاور ناحیه حذف شده در ژن virG انجام گردید، مقایسه ناحیه توالی‌یابی شده با اطلاعات موجود در بانک ژنی نشان داد که ۱۷۵۱ جفت باز از ژن virG از سویه وحشی شیگلا فلکسنری 2a در پلاسمید نوترکیب pSD132ΔvirG دچار گسستگی (حذف) شده است.



شکل ۷: الکتروفورز محصول همسانه‌سازی ژن ΔvirG در ناقل انتحاری pSD132 و محصول PCR تشخیص ژن جهش یافته ΔvirG بر روی ناقلpSD132ΔvirG ژل آگاروز ۱/۸، ۱) نشانگر وزن مولکولی Kb ۱DNA (آلمان، فرمنتاز)، ۲) قطعه ۶۶۷۰ جفت بازی نشان دهنده صحت همسانه‌سازی قطعه ۱۴۸۴ جفت بازی ژن ΔvirG می‌باشد، ۳) محصول PCR تشخیص ژن جهش یافته ΔvirG در ناقل انتحاری pSD132ΔvirG (قطعه ۱۴۸۴ bp).

بحث

تاکنون تلاش‌های بسیار زیادی جهت تولید یک واکسن ایمن و مؤثر 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، مجوز استفاده در حجم وسیع و عمومی را دریافت نکرده‌اند و گاهی مصرف آن‌ها به یک کشور خاص و در گروه سنی خاصی محدود شده است. یکی از مهم‌ترین راهکارهای تولید واکسن علیه شیگلوز تولید واکسن‌های زنده مهاجم و تخفیف حدت یافته می‌باشد زیرا این واکسن‌ها علاوه بر داشتن مصرف خوراکی، توانایی بالایی را در تحریک سیستم ایمنی مخاطی و فعال کردن شدید سیستم ایمنی دارا هستند (۲۳-۲۱).

میترت و همکاران در سال ۱۹۸۴ سویه جهش یافته T32-ISTRATI را با استفاده از تکنیک پاساژ متوالی در شیگلا فلکسنری ۲a 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 (۲۴).

ونکـاتسن و همکاران در سال ۱۹۹۰ سویه کاندید واکسنی T32-ISTRATI را از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی ارزیابی نمودند. ارزیابی‌ها حذف سه لکوس invA، virG و IpaABCD را در پلاسمید تهاجمی شیگلا نشان داد. همچنین کاندید واکسنی شیگلا فلکسنری a2 وابسته

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.1.4.8.5]

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 انتحاری 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 خوکچه هندی بود (۲۶). سویه کاندید وا کسنی CVD1203 (virG،ΔaroAΔ) توسط نورجیا و همکاران در سال ۱۹۹۴ با استفاده از پلاسمیدهای خودکشان pKTN701،pFJ201 ساخته شد (۲۹). نتایج بالینی این سویه واکسنی در خوکچه هندی و انسان در دوز متوسط (در حدود ۱۰۶ CFU) نشان از تحمل‌پذیری بالای آن داشت اما در دوزهای بالاتر (در حدود ۱۰۸ CFU تا ۱۰۹) 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 (guaBAΔ) CVD1204، CVD1203، CVD 1207 (Δset, Δsen, ΔguaBAΔ)، CVD1205 (virG ،ΔguaBA, ΔvirG) و CVD1208 (set, Δsen, ΔguaBAΔ)، بر پایه استفاده از پلاسمیدهای خودکشان و پدیده تبادل آللی 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 دریافت کننده 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 (۱۴-۲۷).

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 قابل ارزیابی و سنجش باشد.

در تحقیقاتی که در آن ایجاد جهش با تکیه بر روش‌های تبادل آللی 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 (Counterselectble) مانند ژن‌های rpsL، SacB و thyA به کار گرفته شده است (۱۳، ۲۰ و ۲۸).

در تحقیق حاضر با توجه به مزایای ناقل pSD132، به منظور ساخت سازه pSD132ΔvirG 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 انتحاری در ایجاد حذف ژنی با تکیه بر پدیده تبادل آللی 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 نرفتن پلاسمید خودکشان در میزبان مورد نظر بر شمرد. اما با توجه به حذف هدفمند ژن مورد نظر در سویه وحشی نسبت به روش‌های اولیه‌تری 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 انتحاری علیرغم معایب اشاره شده در بسیاری از باکتری‌های حدتزا مانند شیگلا اثبات شده است. در مجموع، سازه pSD132ΔvirG با داشتن حدوداً ۶۰۰ جفت باز توالی مشابه با نواحی از ژن هدف (virG) در هر طرف خود، یک پلاسمید انتحاری مناسب برای ایجاد جهش در پلاسمید تهاجمی 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.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.1.4.8.5]

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 relation-ships of entroinvasive 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 develop-ment: human enteric infections. Vac-cine. 2006;24:2732-2750.
5. Bennish M. Potentially lethal compli-cations 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. Identifi-cation of virG, a plasmid locus of Shigella flexneri that governs bacterial intra- and intercellular spread through intraction 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, Urick T, Venkatesan M. Developing live Shigella vaccines using lambda red recombineering. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006;47:462–469.
13. Reyrat J, Pelicic V, Gicquel B, Rappuoli R. Counterselectable Markers: Untapped Tools for Bacterial Genetics and Patho-genesis. 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 characteri-zation of virG (virG)-deleted E.coli K12- S.flexnerri 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 flexneri2a 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, Geiselmann 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, Muyrers J, Stewart A. A new logic for DNA engineering using recombination in Es-cherichia 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 immunogenicityof 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 immunopro-phylaxis and im-munotherapy 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

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-03]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.1.4.8.5]

H, Alam K et al. Altering trends in the dominance of Shigella flexneri serotypes and emergence of serolo-gically 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 charac-terization 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 pen- tavalent 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.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.1.4.8.5]

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 M[1], Saadati M[2], 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 pGEMΔ*virG* vector was digested by use of *SphI* and *SalI* 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::Δ*virG* 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

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-11-03]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.1.4.8.5]