

Designing and Construction of the Suicide Vector pDS132- Δkan^R to Delete Kanamycin Resistance Sequence in Mutant Strain of *Brucella melitensis* Rev1 Mutant Strain in order to Generate a Candidate Vaccine Strain

Zahra Nassaji, Alireza Saeedinia, Mehdi Zeinoddini, Ali Asghar Deldar

Molecular Genetics department, Research Centre for Sciences and Biotechnology, Malek Ashtar University, Tehran, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2015/02/16

Accepted: 2015/12/26

Available online: 2016/07/24

Article Subject:

Microbial Biotechnology

IJMM 2016; 10(2): 23-32

Corresponding author at:

Dr. Alireza Saeedinia

Molecular Genetics
department, Research Centre
for Sciences and
Biotechnology, Malek Ashtar
University, Tehran, Iran

Tel:

09126464943

Email:

f: a.saeedinia@modares.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Brucellosis is a common disease between humans and animals. Vaccination is the best approach to prevent brucellosis. Existing vaccines such as *Rev1* are associated with disadvantages such as abortion in pregnant animals. Therefore, it is necessary to generate an appropriate vaccine that is produced by molecular methods. The aim of this study was designing and construction of pDS132- Δkan^R suicide vector to delete kanamycin resistance sequence (kan^R) in a mutant strain of *Brucella melitensis rev1* to generate a candidate vaccine strain.

Materials and Methods: In this study, the plasmid pDS132 was used as a suicide vector to delete target gene. In order to construct the deletion cassette, two homologous fragments were separately designed and constructed by PCR, and tandemly cloned into the pBluescriptSK(-) vector using appropriate restriction enzymes. Then, the deletion cassette was digested from the recombinant vector by terminal restriction enzymes, and sub cloned into the pDS132 vector to construct the suicide vector pDS132- Δkan^R .

Results: The pDS132- Δkan^R contains 590bp upstream sequences and 421bp downstream sequences on the deletion cassette fragment; it can be used as specific suicide vector to disrupt the kan^R sequence in genome of mutant strain of *Brucella melitensis Rev1*.

Conclusions: The use of suicide pDS132- Δkan^R system facilitated mutant construction which is a more specific and effective system in comparison with the other positive marker-dependent suicide systems and primary techniques such as serial passages.

KeyWords: *Brucella melitensis Rev1*, Suicide vector, Vaccine, Kanamycin

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Nassaji Z, Saeedinia A, Zeinoddini M, Deldar A A. Designing and Construction of the Suicide Vector pDS132- Δkan^R to Delete Kanamycin Resistance Sequence in Mutant Strain of *Brucella melitensis* Rev1 Mutant Strain in order to Generate a Candidate Vaccine Strain. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (2) :23-32

طراحی و ساخت وکتور خودکشی $pDS132-\Delta kan^R$ به منظور حذف ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین در بروسلا ملی تنسیس سویه $Rev1$ جهش یافته برای تولید سویه کاندید واکسن

زهرا نساجی، علیرضا سعیدی نیا، مهدی زین الدین، علی اصغر دلدار

گروه مهندسی ژنتیک، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه مالک اشتر، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: بروسلوزیس از مهم ترین بیماری های مشترک انسان و دام محسوب می گردد. بهترین راه مقابله با بروسلوزیس انجام واکسیناسیون مناسب می باشد. واکسن های موجود از قبیل واکسن $Rev1$ با معایبی چون سقط جنین در حیوانات باردار همراه است لذا تهیه واکسن مناسب برای درمان بروسلوزیس ضروری می باشد. هدف از انجام این مطالعه، طراحی و ساخت وکتور خودکشی $pDS132-\Delta kan^R$ به منظور حذف ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین در بروسلا ملی تنسیس سویه $Rev1$ جهش یافته برای تولید سویه کاندید واکسن بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه برای حذف ترادف هدف، تصمیم به استفاده از پلاسمید $pDS132$ به عنوان وکتور خودکشی گرفته شد. بمنظور ساخت کاست حذف، پس از طراحی و سنتز جداگانه قطعات دارای همولوژی با ترادف های هدف، این قطعات جهت ساخت قطعه واحد، با استفاده از آنزیم های محدودگر مناسب در وکتور $pBluescriptSK(-)$ کلون شد. سپس به منظور ساخت وکتور خودکشی، قطعه کاست حذف با استفاده از آنزیم های محدودگر مناسب از وکتور فوق جدا و در وکتور $pDS132$ ساب کلون گردید.

یافته ها: وکتور خودکشی $pDS132-\Delta kan^R$ با در برداشتن ۵۹۰ جفت باز از توالی بالادست و ۴۲۱ جفت باز از توالی پایین دست ترادف هدف می تواند به عنوان یک ناقل خودکشی اختصاصی در ایجاد تداخل در ژن kan^R در ژنوم باکتری بروسلا ملی تنسیس سویه $Rev1$ جهش یافته موجب حذف مقاومت آنتی بیوتیکی در آن بشود.

نتیجه گیری: استفاده از سیستم خودکشی مورد نظر با استفاده از وکتور $pDS132-\Delta kan^R$ ایجاد جهش هدفمند را تسهیل و در مقایسه با سایر روش های خودکشی وابسته به مارکر مثبت و نیز روش های ابتدایی مانند پاساژ متوالی، روش موثرتری می باشد.

کلمات کلیدی: بروسلا ملی تنسیس $Rev1$ ، وکتور خودکشی، واکسن، کانامایسین

کپی رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۷

پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۵

انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۰۵/۰۳

موضوع:

بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM 1395; 10(2): 23-32

نویسنده مسئول:

دکتر علیرضا سعیدی نیا

گروه مهندسی ژنتیک پژوهشکده

علوم و فناوری زیستی دانشگاه

مالک اشتر تهران ایران

تلفن: ۰۹۱۲۶۴۶۴۹۴۳

پست الکترونیک:

a.saeedinia@modares.ac.ir

مقدمه

بروسلا بر خلاف سایر ارگانیسیم ها، عوامل و فاکتورهای مهاجمی مانند کپسول، آگزوتوکسین، سیتولیزین ها و سایر عوامل مهاجمی را ندارد، لیکن داشتن خصوصیات مهم دیگری باعث شده است که این باکتری بتواند در درون میزبان باقی بماند و تکثیر کند (۲). بروسلا یکی از باکتری های گروه آلفا پروتئوباکتیریا (α -Proteobacteria) می باشد که یک عامل زئونوز (Zeonoz) (۱).

باکتری های بروسلا (Brucella) شامل گونه های مختلفی است که از نظر میکروسکوپی اغلب به صورت کوکوباسیل به طول ۰/۶ تا ۱/۵ و به عرض ۰/۵ تا ۰/۷ میکرون می باشند. شکل بیضی یا باسیل طویل آن ۹ میکرون است و گاهی به شکل دوتایی یا زنجیر مانند دیده می شوند که این اشکال طویل یا استثنایی باکتری بیشتر در محیط کشت مشاهده می شود (۱). باکتری

ژنتیک و نوترکیبی همولوگ که بر مبنای حذف هدفمند ژن‌های بیماری‌زای استوارند جایگزین گردیدند که اغلب از این فرآیندها به‌عنوان "مهندسی ژنتیک معکوس" (Reverse genetic engineering) تعبیر می‌شود. یکی از این روش‌های جدید در مهندسی ژنتیک، استفاده از ناقل‌های خودکشی به منظور ایجاد گسستگی در ژن هدف با تکیه بر رخداد تبادل آلی در باکتری‌ها می‌باشد (۱۴-۱۱).

در این مطالعه، ما تلاش به ساخت پلاسمید انتحاری در $pDS132-\Delta kan^R$ (Suicide) به منظور ایجاد جهش در ژن کانامایسین موجود در ژنوم *Rev1* جهش یافته حاصل از تحقیقات سعیدی‌نیا و همکاران داشتیم.

مواد و روش‌ها

سویه‌ها، ناقل‌ها و مواد مورد استفاده

در این مطالعه از باکتری *بروسلا ملی تنسیس* سویه *Rev1* جهش یافته حاصل از تحقیقات *Saeedinia* و همکاران استفاده گردید (۹). باکتری در محیط‌های کشت مایع TSB و جامد TSA (Fluka) کشت داده شد. کشت TSB با دوز مناسب از سویه بمدت ۹۶-۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس صورت گرفت. باکتری *اشریشیا کلی* سویه‌های *DH5 α* (Fermentase) و *SM10 λ pir* در محیط‌های کشت مایع و جامد LB (Fluka) تحت دمای ۳۷ درجه سلسیوس بمدت ۱۶ ساعت کشت داده شدند. ناقل‌های مورد استفاده *pDS132* و *pBluescriptSK(-)* (Fermentase) بودند. آنزیم‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل آنزیم‌های برش دهنده *EcoRI*، *SacI* و *Sall* و آنزیم *T4 DNA ligase* جهت واکنش الحاق (Ligation) که از شرکت Fermentase تهیه گردید. آنزیم‌های DNA پلیمرازی Taq و PFU مورد استفاده در واکنش PCR، از شرکت Roche (Germany) خریداری شد.

طراحی و ساخت کاست حذف

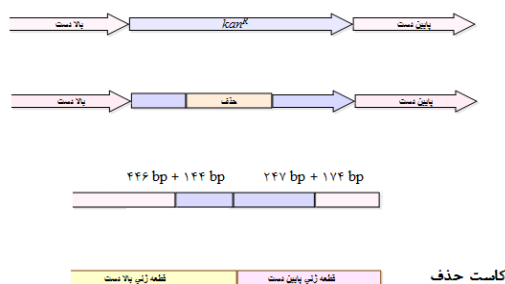
برای طراحی کاست حذف (Deletion cassette)، با توجه به ترادف ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین در ژنوم سویه *Rev1* جهش یافته و ترادف‌های بالادست و پایین دست آن، توالی قطعات همولوژی (قطعه ژنی بالادست و پایین دست) انتخاب شد. برای این کار ۴۴۶ bp از ترادف بالادست *kan^R* در ژنوم به همراه ۱۴۴bp از ترادف انتهای ۵' خود *kan^R* مجموعاً به عنوان قطعه

بوده و از حیوان به انسان منتقل می‌گردد. بیماری ناشی از باکتری *بروسلا*، *بروسلوزیس* یا تب مالت خوانده می‌شود و تقریباً در اکثر نقاط دنیا دیده می‌شود (۳، ۴). امروزه کنترل بیماری *بروسلوزیس* بر اصل کشتن دام‌های آلوده، پاستوریزه کردن محصولات لبنی و واکسیناسیون استوار است. واکسیناسیون دام‌ها بر پایه‌ی تلقیح سویه‌های زنده ضعیف شده *بروسلا آبورتوس* (S19 و ۴۵/۲۰) و *بروسلا ملی تنسیس* (*Rev1*) است (۵، ۶). استفاده از این واکسن‌ها در دام با محدودیت‌هایی همراه است. برای مثال، تولید آنتی بادی‌ها بر علیه بخش O-PS از ساختار LPS دیواره باکتری در دام‌های واکسینه شده که مانع از تفکیک آنها از دام‌های مبتلا به سویه وحشی در تست‌های تشخیصی می‌گردد. همچنین بروز سقط جنین و ابتلا به *بروسلوزیس* در این حیوانات، باعث شده تا تلقیح این واکسن‌ها در دام‌ها با احتیاط انجام گیرد. همچنین واکسن‌های *بروسلوزیس* انسانی بر پایه‌ی پیکره کامل باکتری غیرفعال شده و یا سویه‌های زنده تخفیف حدت یافته با دو مشکل اساسی مواجه هستند: نخست آنکه گاهی ایجاد بیماری می‌نمایند، دوم آنکه با واکنش‌های ازدیاد حساسیت ناخواسته همراه می‌باشند (۷، ۸). لذا تهیه واکسن مناسب بویژه واکسن زنده ضعیف شده برای درمان *بروسلوزیس* با استفاده از روش‌های مولکولی ضروری می‌باشد. بدین منظور سویه جهش یافته‌ی ضعیف شده‌ای از *Rev1* توسط تیم تحقیقاتی *Saeedinia* و همکاران تهیه گردیده است (۹). سویه فوق نیاز به انجام یکسری کارها برای بهینه سازی داشت. یکی از این موارد، حذف ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین در این سویه می‌باشد، چراکه سویه‌های مورد استفاده بعنوان واکسن نباید حامل هر گونه مقاومت آنتی بیوتیکی باشند.

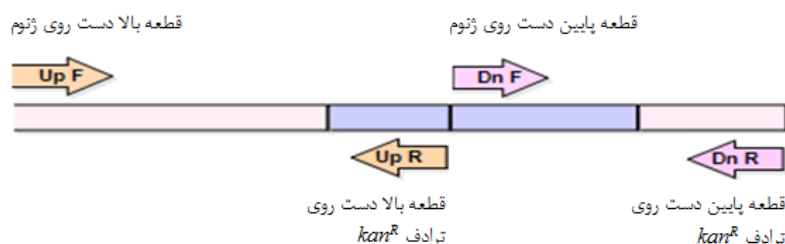
روش‌های مختلفی جهت حذف و غیرفعال کردن ژن‌ها در باکتری‌ها گزارش شده است که برای درک بیولوژی مولکولی، فیزیولوژی، تنظیم ژنتیکی و بیماری‌زایی ارگانیسم‌ها بسیار حائز اهمیت است. در گذشته حذف ژن‌های باکتریایی اغلب به وسیله جهش زایی ترانسپوزون‌ها (Transposon) انجام می‌شد. در این مورد برای پیدا کردن حذف در ژن مورد نظر غربالگری سختی نیاز بود. نوترکیبی یک راه جدید برای ایجاد جهش مستقیم روی کروموزوم باکتریایی را فراهم می‌کند (۱۰). روش‌های اولیه‌ای که برای ایجاد سویه‌های تخفیف حدت یافته به منظور تولید واکسن در باکتری و ویروس‌های بیماری‌زا وجود داشتند فاقد اختصاصیت بودند، به همین دلیل توسط تکنیک‌های پیشرفته‌تر مهندسی

به منظور تکثیر قطعات ژنی بالادست و پایین دست، دو جفت پرایمر اختصاصی طراحی و سنتز گردید. طراحی پرایمرها با استفاده از ترادفهای موجود در بانک ژنی برای ژنوم سویه *Rev1* با شماره دسترسی (EQ999561) و برای ترادف *kan^R* با شماره دسترسی (X06404) و با کمک نرم افزار Gene Runner (Hastings Software, In. ,version 3.05) صورت گرفت. جایگاه برش آنزیم *Sall* روی پرایمر پیشرو و جایگاه برش آنزیم *EcoRI* روی پرایمر معکوس قطعه ژنی بالادست تعبیه شد. همچنین جایگاه برش آنزیم *EcoRI* روی پرایمر پیشرو و جایگاه برش آنزیم *SacI* روی پرایمر معکوس قطعه ژنی پایین دست تعبیه گردید. ترادف پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ و جایگاه هرکدام بصورت شماتیک در شکل ۲ ارائه شده است.

بالادست و ۱۷۴ bp از ترادف پایین دست *kan^R* در ژنوم به همراه ۲۴۷bp از ترادف انتهای ۳' خود *kan^R* مجموعاً به عنوان قطعه پایین دست، انتخاب شد (شکل ۱)؛ بنابراین توالی قطعه بالادست مجموعاً به طول ۵۹۰ bp و توالی قطعه پایین دست مجموعاً به طول ۴۲۱ bp بود.



شکل ۱: تصویر شماتیک از مراحل طراحی کاست حذف



شکل ۲: جایگاه شماتیک اتصال پرایمرها بروی قطعه کاست حذف

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	سکانس پرایمر (۳'→۵')	جایگاه اتصال پرایمر
Up F	GGCTGTCGACCTTAGGGAATTTGGACTCATTACG	قطعه بالا دست روی ژنوم
Up R	GTGAGAATTCATCGGGCTTCCCATAACAATCG	قطعه بالا دست روی ترادف <i>kan^R</i>
Dn F	GTTGGAATTCGGATTCAGTCGTCACTCATGGTG	قطعه پایین دست روی ژنوم
Dn R	TTAAGAGCTCAGGCCTATCGCAAAGACACGC	قطعه پایین دست روی ترادف <i>kan^R</i>

pBluescriptSK(-) کلون شد و بدنبال آن، قطعه ژنی پایین دست تکثیر یافته نیز در همان پلاسمید کلون گردید.

هر واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر و شامل ۰/۴ میکرومول از هر پرایمر، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط نوکلئوتیدهای dATP، dGTP، dCTP و dTTP و ۲/۵ واحد از آنزیم *Pfu* *MgSO₄* ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10x، ۲/۵ میکرولیتر از *MgSO₄* و ۵۰ نانوگرم از DNA بود. چرخه‌های PCR شامل مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵

به منظور ساخت کاست حذف، ابتدا مولکول DNA ژنومی سویه *Rev1* جهش یافته با استفاده از کیت تجاری و بر اساس دستورالعمل ارائه شده بوسیله شرکت سازنده (Bioneer, Korea)، استخراج شد. سپس واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده و از روی DNA ژنومی سویه *Rev1* جهش یافته بعنوان الگو، صورت گرفت. در نهایت، ابتدا قطعه ژنی بالادست تکثیر یافته درون پلاسمید

ساخت وکتور خودکشی pDS132- Δkan^R

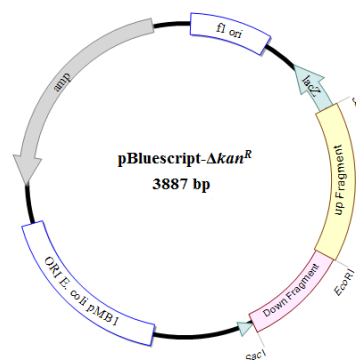
جهت ساخت وکتور خودکشی، هر دو پلاسمید pBluescript- Δkan^R و پلاسمید pDS132 با آنزیم‌های *SalI* و *SacI* برش داده شدند. سپس محصولات واکنش هضم روی ژل آگاروز یک درصد بررسی شد. محصول واکنش هضم پلاسمید pDS132 (پلاسمید برش خورده) و محصول واکنش هضم پلاسمید pBluescript- Δkan^R (کاست حذف) به صورت جداگانه با استفاده از کیت تخلیص از روی ژل، خالص سازی شده و جهت انجام الحاق کاست حذف به پلاسمید pDS132 آماده گردید. پس از انجام الحاق، محصول الحاق از طریق الکتروپوریشن (Electroporation) با استفاده از دستگاه مولتی پوریتور (Multiporator Eppendorf, Germany) درون سلول‌های مستعد *E. coli* سویه *SM10 λpir* منتقل شد. تهیه سلول‌های مستعد و انجام الکتروپوریشن مطابق دستورالعمل شرکت صورت گرفت. بدین منظور ۱ میکرولیتر (۱۰ pg) از محصول الحاق با ۴۰ میکرولیتر از سلول‌های مستعد مخلوط شده و داخل کووت ۱mm سرد انتقال یافت. الکتروپوریشن با ولتاژ ۲۵۰۰ در ۵ ms انجام گرفت. بلافاصله بعد از انجام الکتروپوریشن، ۱ میلی لیتر از محیط LB مایع بدون آنتی بیوتیک درون کووت اضافه شده و پس از انتقال درون میکروتیوپ استریل به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس مقادیر مشخصی از محیط فوق روی پلیت‌های LB جامد حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل با غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر انتقال یافته و به مدت یک شبانه روز تحت دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت.

از روش‌های ذکر شده برای تأیید کلون کردن کاست حذف در *DH5 α* ، برای تأیید کلونینگ در *SM10 λpir* نیز استفاده می‌شود.

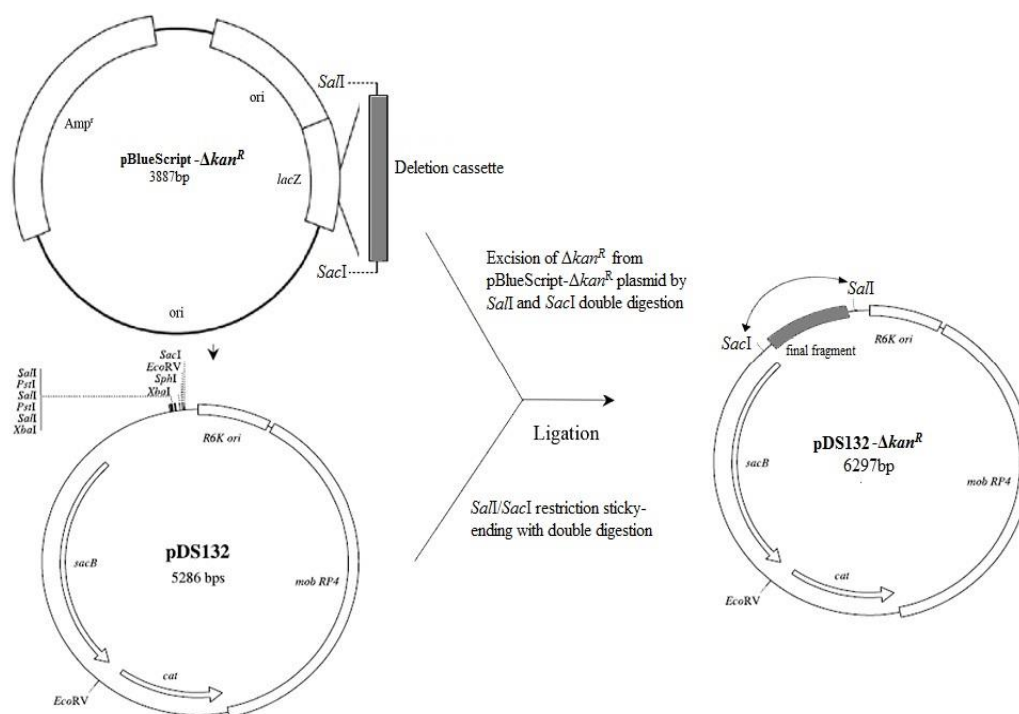
تمامی مراحل ساخت وکتور خودکشی pDS132- Δkan^R بصورت شماتیک در شکل ۴ ارائه شده است.

دقیقه و دوره سه مرحله‌ای شامل واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به رشته الگو در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل سازی قطعه موردنظر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در پایان، مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود.

به منظور کلون کردن قطعه ژنی بالادست در پلاسمید pBluescriptSK(-)، ابتدا هر دوی قطعه ژنی و پلاسمید با آنزیم‌های *SalI* و *EcoRI* برش داده شدند. سپس محصول حاصل از واکنش با استفاده از کیت تخلیص از روی ژل (Bioneer, Korea)، خالص سازی شده و جهت انجام الحاق آماده گردید. پس از انجام الحاق پلاسمیدهای نو ترکیب، محصول الحاق به درون سلول *E. coli* سویه *DH5 α* که با کلرید کلسیم مستعد شده بودند، با روش شوک حرارتی منتقل شد. جهت تأیید کلون سازی قطعه ژنی بالادست از دو روش colony-PCR و هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های مثبت، استفاده شد. پس از تأیید کلون سازی قطعه ژنی بالادست، قطعه ژنی پایین دست و پلاسمید نو ترکیب حاصل (که در آن قبلاً قطعه بالا کلون شده بود) هر دو با آنزیم‌های *SacI* و *EcoRI* برش داده شدند. محصول واکنش هضم با استفاده از کیت تخلیص از روی ژل خالص سازی شد و جهت انجام الحاق آماده گردید. بقیه مراحل کلونینگ و تأیید آن به روشی که قبلاً ذکر شد صورت گرفت. بدین ترتیب پلاسمید نو ترکیب حاصل در این مرحله (pBluescript- Δkan^R) حامل قطعه کامل کاست حذف سنتز شده بود (شکل ۳).



شکل ۳: تصویر شماتیک وکتور نو ترکیب pBluescript- Δkan^R

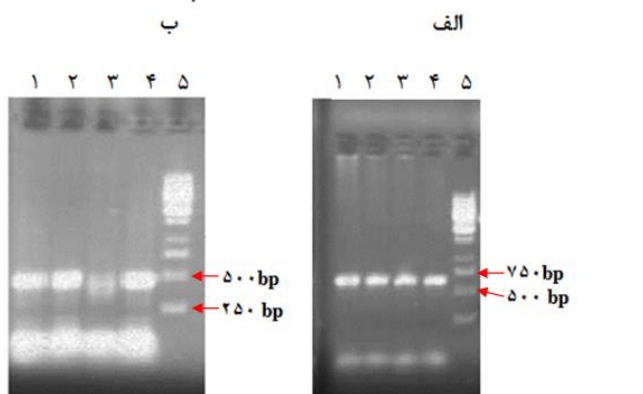


شکل ۴: خلاصه مراحل ایجاد ناقل خودکشی pDS132-ΔkanR؛ پس از همسانه سازی قطعات در حامل pBluescriptSK(-) و ایجاد کاست حذف، این قطعه در حامل خودکشی pDS132 مجدداً همسانه سازی شد.

یافته‌ها

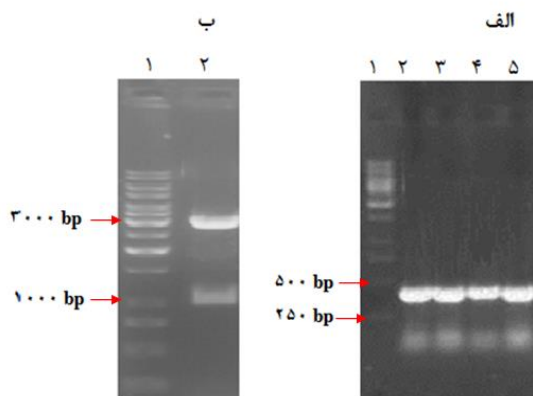
طراحی و ساخت کاست حذف

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تکثیر قطعات ژنی؛ بمنظور بدست آوردن توالی ژنی مناسب واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با دستورالعملی که به آن اشاره شد، انجام گرفت. شکل ۵ نتایج حاصل از واکنش PCR را نشان می‌دهد.

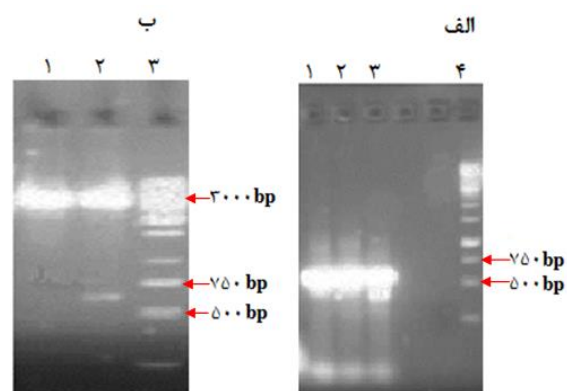


شکل ۵: نتایج حاصل از تکثیر قطعات ژنی بالا و پایین بر روی ژل الکتروفورز ۱ درصد. (الف) واکنش PCR بر روی DNA ژنومی سویه Rev1 برای تکثیر قطعه ژنی بالا. (ستون‌های ۱-۴) تکثیر با پرایمرهای Up F و Up R (bp 590)، (ستون ۵) نشانگر وزن مولکولی DNA 1Kb. (ب) واکنش PCR بر روی DNA ژنومی سویه Rev1 برای تکثیر قطعه ژنی پایین. (ستون‌های ۱-۴) تکثیر با پرایمرهای Dn F (bp 421) و Dn R، (ستون ۵) نشانگر وزن مولکولی DNA 1Kb.

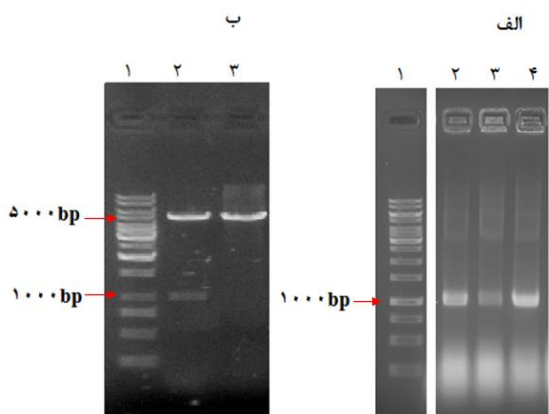
در این پژوهش ابتدا قطعه ژنی بالا ابتدا در وکتور کلونینگ pBluescriptSK(-) کلون شد. برای این کار ابتدا وکتور مذکور توسط آنزیم‌های *SalI* و *EcoRI* برش داده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نیز با این دو آنزیم برش داده شد. واکنش الحاق انجام شده و محصول آن به باکتری *DH5α* ترانسفرم شد. جهت تأیید کلونینگ نقشه آنزیمی وکتور نوترکیب pBlueScript تهیه و PCR از روی پلاسمید نوترکیب انجام شد (شکل ۶).



شکل ۷: نتایج حاصل از کلون سازی قطعه ژنی پایین و ساخت کاست حذف بر روی زل آگارز ۱ درصد. (الف) واکنش PCR از روی پلاسمید نوترکیب با پرایمرهای Dn R و Dn F (ستون ۱) نشانگر وزن مولکولی DNA، محصول PCR قطعه ژنی پایین. قطعه ۴۲۱ صحت کلون سازی را تأیید نمود. (ب) محصول برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های محدود کننده *SacI* و *Sall* (ستون ۱) نشانگر وزن مولکولی DNA، کاست حذف با طول ۱۰۱۱ bp.



شکل ۶: نتایج حاصل از کلون سازی قطعه ژنی بالا بر روی زل آگارز ۱ درصد. (الف) واکنش PCR از روی پلاسمید نوترکیب با پرایمرهای Up و Up F. (ستون‌های ۱-۳) محصول PCR قطعه ژنی بالا، قطعه ۵۹۰ صحت کلونینگ را تأیید نمود. (ستون ۴) نشانگر وزن مولکولی DNA 1Kb. (ب) محصول برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های محدود کننده *Sall* و *EcoRI* (ستون ۱) پلاسمید غیر نوترکیب برش خورده با آنزیم‌های فوق، (ستون ۲) پلاسمید نوترکیب برش خورده با آنزیم‌های فوق، قطعه ۵۹۰ جفت بازی صحت کلون سازی را نشان می‌دهد.



شکل ۸: بررسی نتایج حاصل از ساخت وکتور خودکشی بر روی زل آگارز ۱ درصد. (الف) واکنش PCR از روی وکتور خودکشی با پرایمرهای Up و F (ستون ۱) نشانگر وزن مولکولی DNA 1Kb، (ستون‌های ۲-۴) واکنش PCR از روی پلاسمید نوترکیب، قطعه ۱۰۱۱ bp همسانه سازی و ساخت وکتور خودکشی را تأیید نمود. (ب) محصول برش آنزیمی وکتور خودکشی با آنزیم‌های محدود کننده *Sall* و *SacI* (ستون ۱) نشانگر وزن مولکولی DNA 1kb، (ستون ۲) پلاسمید نوترکیب برش خورده با آنزیم‌های فوق، قطعه ۱۰۱۱ bp، نشان دهنده ساخت وکتور خودکشی است، (ستون ۳) پلاسمید غیر نوترکیب برش خورده با آنزیم‌های فوق.

قطعه ژنی پایین در وکتور کلونینگ pBluescriptSK(-) که قبلاً قطعه بالا در آن کلون شده بود کلون شد. برای این کار وکتور مذکور توسط آنزیم‌های *EcoRI* و *SacI* برش داده شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نیز با این دو آنزیم برش داده شد. واکنش الحاق انجام شده و محصول آن به باکتری *DH5a* ترانسفرم شد. جهت تأیید کلونینگ نقشه آنزیمی وکتور pBluescript- Δkan^R تهیه و PCR از روی پلاسمید نوترکیب انجام گردید (شکل ۷).

ساخت وکتور خودکشی pDS132

برای این کار قطعه واحد با برش آنزیمی توسط آنزیم‌های *Sall* و *SacI* از وکتور اول جدا گردید. پس از برش حامل PDS132 با آنزیم‌های مذکور واکنش الحاق انجام شده و محصول آن به باکتری *SM10 λpir* ترانسفرم شد جهت تأیید کلونینگ نقشه آنزیمی وکتور خودکشی PDS132- Δkan^R تهیه شد و PCR از روی پلاسمید نوترکیب انجام گردید (شکل ۸).

بحث

مهندسی ژنتیک معکوس روش قدرتمندی برای شناسایی کارکرد ژن‌ها و ایجاد جهش و یا غیرفعال سازی ژن مورد نظر و ارزیابی و سنجش تاثیرات آن بر روی میکروارگانیسم هدف می‌باشد. در تحقیقاتی که در آن ایجاد جهش با تکیه بر روش‌های تبادل آلی انجام پذیرفته است از وکتورهای خودکشی بهره گرفته شده است. اگرچه این تکنیک در بسیاری از باکتری‌ها کارایی دارد، اما بسیار پیچیده می‌باشد (۱۴).

این وکتورها را می‌توان برای انجام تبادل آلی ژن وحشی به وسیله پلاسمیدی که آلل جهش یافته را کد می‌کند، استفاده کرد. این یک روش دو مرحله‌ای با ادغام پلاسمید در ژن هدف توسط یک رویداد نوترکیبی است که با خروج آن از طریق کراسینگ آور دوم دنبال شده و در نهایت موجب تبادل آلی می‌شود. ادغام پلاسمید در کروموزوم می‌تواند با مارکرهای آنتی‌بیوتیکی استفاده شده برای تخریب ژن هدف غربال‌گری شوند (نوترکیبی اول). خروج پلاسمید ادغام شده که موجب تعویض آلی می‌شود (نوترکیبی دوم) ممکن است به وسیله نشانگرهای شمارشگر انتخاب شونده (Counterselectable) (۱۶)، (۱۵) و یا براساس مقاومت آنتی‌بیوتیکی غربال شوند (۱۷). اگر پلاسمید هنوز در کروموزوم ادغام باشد سلول در حضور ترکیب counter-selective از بین خواهد رفت (۱۰). دو نوع پلاسمید خودکشی مهندسی شده است: ۱. پلاسمیدهای حساس به دما مانند pSC۱۰۱ (۱۸)، pK۳ و مشتقات آنها (۱۹). ۲. پلاسمیدهایی با منشأ همانندسازی از R۶K، مانند pCVD۴۴۱ و مشتقات آن (۲۰). تکثیر پلاسمیدهای نوع اول تنها در دمای مجاز امکان پذیر است، در حالی که نوع دوم از پلاسمیدها تنها در سویه‌هایی که پروتئین π از فاژ λ را دارند تکثیر می‌شود (۱۰).

همانطوریکه Haling و همکارانش شرح داده‌اند، پلاسمیدهای مشتق از ColE1 که دارای طیف میزبانی پایینی هستند، قادر به تکثیر در سویه‌های مختلف بروسلا نبوده و می‌توانند زمانیکه حامل ترادف DNA بروسلا هستند، به عنوان وکتور خودکشی عمل بکنند (۲۱)؛ اما فرکانس پایین نوترکیبی در حالت کراسینگ‌آور دوطرفه (Double crossover) و جداسازی سویه‌های جهش یافته موردنظر که سهم بسیار کمی از سویه‌های تراریخت شده را تشکیل می‌دهند از مشکلات این پلاسمیدها می‌باشد؛ اما به منظور حل کردن مشکل فوق در برخی از تحقیقات نشانگرهای شمارشگر انتخاب شونده مانند ژن‌های

SacB^۱، rpsL^۲ و thyA^۳ به کار گرفته شده است (۲۲، ۱۰). مزایای استفاده از این وکتورها این است که هیچ مارکر یا اثری از خود در کروموزوم باقی نمی‌گذارند بنابراین می‌توانند برای ایجاد ترکیبی از چند جهش به کار روند (۱۲).

در این مطالعه، با توجه به مزایای ناقل pDS132، به منظور ساخت سازه PDS132- Δkan^R مورد استفاده قرار گرفت. این پلاسمید به دلیل حضور ژن گزارشگر SacB، وجود ناحیه mob (از پلاسمید RP4) و داشتن منشأ همانندسازی از پلاسمید R6K کاندید مناسبی به عنوان یک ناقل خودکشی در ایجاد حذف ژنی با تکیه بر پدیده تبادل آلی می‌باشد. معایب استفاده از این تکنیک را می‌توان، 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 شمرده؛ اما با توجه به حذف هدفمند ژن مورد نظر در سویه وحشی نسبت به روش‌های اولیه‌ای مانند پاساژ متوالی برتری قابل توجهی را داراست. امروزه در دوران پس از ژنومیکس، با مشخص شدن توالی ژنومی موجودات پروکاریوت مانند *شریشیا کلی*، سالمونلا و شیگلا و غیره استفاده از این تکنیک‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (۱۲، ۲۳).

تقدیر و تشکر

از کلیه کارکنان آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه صنعتی مالک اشتر و جناب آقای دکتر امین مرعشی بخاطر در اختیار قرار دادن سویه SM10 تشکر می‌نمایم.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

¹ B. subtilis gene encoding levansucrase that converts sucrose to levans, which is harmful to the bacteria

² Encodes the ribosomal subunit protein (S12) target of streptomycin

³ Encodes thymidilate synthetase, which confers sensitivity to trimethoprim and related compounds

References

- López-Goñi I, O'Callaghan D. *Brucella: Molecular Microbiology and Genomics*: Horizon Scientific Press; 2012.
- Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. *Brucella*: a pathogen without classic virulence genes. *Vet microbiol*. 2008;129(1):1-14.
- Diaz R, Jones LM, Leong D, Wilson J. Surface antigens of smooth brucellae. *J Bacteriol*. 1968;96(4):893-901.
- N Xavier M, A Paixao T, B den Hartigh A, M Tsolis R, L Santos R. Pathogenesis of *Brucella* spp. *Open Vet J*. 2010;4(1)
- Schurig GG, Sriranganathan N, Corbel MJ. *Brucellosis vaccines: past, present and future*. *Vet Microbiol*. 2002;90(1):479-96.
- Ragan VE. The animal and plant health inspection service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. *Vet Microbiol*. 2002;90(1):11-8.
- Corbel MJ. *Brucellosis: an overview* *Emerg. Infect. Dis*. 1997;3(2):213.
- Young EJ. An overview of human brucellosis. *Clin Infect Dis*. 1995;21(2):283-9
- Saeedinia AR, Zeinoddini M, Soleimani M, Sadeghizadeh M. A new method for simultaneous gene deletion and down-regulation in *Brucella melitensis* Rev. 1. *Microbiol Res*. 2015;170:114-23
- Reyrat J-M, Pelicic V, Gicquel B, Rappuoli R. Countersselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect Immun*. 1998;66(9):4011-7.
- Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic Engineering Using Homologous Recombination 1. *Ann Rev gene*. 2002;36(1):361-88.
- Philippe N, Alcaraz J-P, Coursange E, Geiselmann J, Schneider D. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. *Plasmid*. 2004;51(3):246-55.
- Bej AK, Perlin MH, Atlas RM. Model suicide vector for containment of genetically engineered microorganisms. *Appl Environ Microbiol*. 1988;54(10):2472-7.
- Ortiz-Martín I, Macho AP, Lambersten L, Ramos C, Beuzón CR. Suicide vectors for antibiotic marker exchange and rapid generation of multiple knockout mutants by allelic exchange in Gram-negative bacteria. *J Microbiol Methods*. 2006;67(3):395-407.
- Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP, Stewart AF. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nature genetics*. 1998;20(2):123-8.
- Selbitschka W, Niemann S, Pühler A. Construction of gene replacement vectors for Gram- bacteria using a genetically modified sacRB gene as a positive selection marker. *Appl Environ Microbiol*. 1993;38(5):615-8.
- Miller VL, Mekalanos JJ. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol*. 1988;170 (6): 2575-83.
- Cornet F, Mortier I, Patte J, Louarn J-M. Plasmid pSC101 harbors a recombination site, psi, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site dif. *J Bacteriol*. 1994;176(11):3188.
- Link AJ, Phillips D, Church GM. Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J Bacteriol*. 1997;179(20):6228-37.
- Donnenberg MS, Kaper JB. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun*. 1991;59(12):4310-7.
- Halling SM, Dettleux P, Tatum F, Judge B, Mayfield J. Deletion of the BCSP31 gene of *Brucella abortus* by replacement. *Infect Immun*. 1991;59(11):3863-8.
- Nakashima N, Miyazaki K. Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. *Int J Mol Sci*. 2014;15(2):2773-93.
- Hosseini M, Saadati M, Nayeri Fasaei B, Ahmadydaneh H, Mirzaei M, Bagheri K, et al. Construction of pDS132::Δ icsA for targeted deletion of a region of icsA gene in order to generate a live attenuated *Shigella* vaccine. *Arak Medical University Journal*. 2012;15(2):35-47. [In Persian]