ساخت سویه زنده تخفیف حدت یافته Δ mxiA با استفاده از سیستم λ Red recombinase در شیگلاهای جدا شده در ایران

یاسر احسنی آرانی[۱]، مجتبی سعادتی[۲]، سید مصطفی حسینی[۳]*، منصور حیدری[۴]، عباس بهادر[۵]، رضا رئوفیان[۶]، احمد رضا صالحی[۱]، زهرا هاشمی زاده[۷]، نعیمه هاشمی آرانی[۸]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد پژوهشکده علوم زیستی دانشگاه جامع امام حسین (ع)
۲. دانشیار گروه علوم زیستی دانشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین (ع)
۳. کارشناس ارشد سلولی و مولکولی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)
۴. دانشیار گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵. استادیار گروه باکتری شناسی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۶. دانش آموخته دکتری تخصصی ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۷. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۸. دانش آموخته کارشناسی ژنتیک دانشگاه شاهد تهران

* **نشانی برای مکاتبه:** تهران، خ ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی ، ۰۹۳۷۲۶۹۷۷۷۴،
Geneticman2005@gmail.com

دریافت مقاله: خرداد نود پذیرش برای چاپ: مرداد نود

چکیده

سابقه و هدف: *شیگلوز یکی از بیماری های حاد دستگاه گوارش است. با توجه به شیوع و ظهور سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک، ساخت سویه های واکسنی تخفیف حدت یافته با توجه به هزینه های بالای درمان آنتی بیوتیکی و نیز تهیه آنتی بیوتیک های جدید ضرورتاً مورد نیاز می باشد. این مطالعه با هدف ساخت سویه زنده تخفیف حدت یافته mxiA Δ با استفاده از سیستم λ Red recombinase در شیگلا جدا شده در ایران صورت گرفت.*

روش کار: *در این مطالعه، در مجموع ۴۸ سویه شیگلا دیسانتری از بیمارستان های میلاد، فیروز آبادی و مرکز طبی کودکان که در سال های ۸۵ تا ۸۹ از بیماران جدا گردیده بود جمع آوری شد. با استفاده از آزمون های بیوشمیایی، سرولوژیکی و PCR، گونه و سروار شیگلا جدا شده تایید گردید. پلاسمید pKD46 به داخل شیگلای جدا شده الکتروترانسفورم گردید و سپس، سویه جهش یافته با جایگزینی کاست کلرامفنیکل که از دو طرف با جایگاه شناسایی پروتئین FLP همجوار شده بود از طریق نوترکیبی هومولوگ ایجاد شد. صحت فرآیند با واکنش PCR و انجام تعیین توالی تایید گردید.*

یافته ها: *آزمون های بیوشمیایی، سرولوژیکی و PCR نشان داد که ۳ سویه از مجموع سویه ها (۶/۲۵٪)، از گونه دیسانتری و سروار تیپ۱ می باشند. حضور ژن mxiA با انجام واکنش PCR تایید شد. نتایج تعیین توالی و واکنش PCR، حذف ۲۰۶۱ حفت باز از ژن mxiA را تایید نمود.*

نتیجه گیری: *استفاده از سیستم λ Red recombinase ایجاد جهش را تسهیل و در مقایسه با سایر تکنیک ها همچون ناقل های انتحاری روش موثر و ارزان تر می باشد.*

واژگان کلیدی: شیگلوز، شیگلا، mxiA ، سیستم λ Red recombinase نوترکیبی هومولوگ.

مقدمه

شیگلا دیسانتری باکتری گرم منفی، بی هـوازی اختیـاری، بـدون اسـپور و جزء خانواده انتروباکتریاسه می باشد(۱). گونه های جنس شیگلا بـه چهـار گروه دیسانتری (S. dysenteriae)، فلکسنری (S. flexneri)، سونه ای (S. sonnei) و بویـدی (S. boydii) تقـسیم مـی شـوند. شـیگلا عامـل بیماری شیگلوز است. شیگلوز، بیمـاری عفـونی اسـت کـه بخـشی از روده کوچک در انسان را مورد تهاجم قرار می‌دهد. علائم بالینی شـیگلوز شـامل اسهال آبکی به همراه مقادیر مختلفی از خون، تب، حالت تهوع، اسـتفراغ و درد شکمی می باشد(۲، ۳). در بین گونه های شـیگلا، شـیگلا دیـسانتری علاوه بر علائم فوق، باعـث تـشنج، ناهنجـاری سیـستم اعـصاب مرکـزی و بیماری Hemolytic Uremic Syndrom (HUS) نیز مـی گـردد(۳-۱). تقریباً ۹۹ درصد از عفونت های شیگلا در منـاطق در حـال توسـعه رخ می دهد و سالانه درحدود ۱/۱ میلیون نفر از مبتلایان به شیگلوز در سراسر جهان می میرند که تقریباً ۶۰٪ آنها را کودکـان زیـر ۵ سـال تـشکیل مـی دهند(۴، ۵).

باکتری شیگلا پس از ورود به بدن، از طریق ترشح فاکتور های حـدت زای خود (توسط ماشین ترشحی نوع سـوم) وارد سیتوپلاسـم سـلول پوشـشی دیواره روده شده و پس از تکثیر در این ناحیه نهایتاً باعث انتشار و گسترش عفونت می گردد(۶). یکی از مهمترین لکـوس هـای ژنـی حـدت زا کـه در گردهم آیی (assembly) این ماشین ترشحی نقش اساسی بر عهـده دارد، لوکوس mxi (membrane expression of ipas) می باشد، که از آن به عنوان جزیره آسـیب زایـی PIA (Patogeneticity island) شـیگلا نیز یاد می شود(۷). این لوکوس (locus) ژنی در تشکیل سیستم ترشـحی نوع III و ترشح فاکتور های حـدت زای شـیگلا نقـش اساسـی بـر عهـده دارد(۸،۹). ژن mxiA نیز یکی از مهمترین ژن های این لوکوس ژنی است که اندازه ای برابر بـا ۲۰۶۱ جفـت بـاز دارد. پـروتئین ایـن ژن دارای وزن تقریبی ۷۱ کیلودالتون بوده و جـزء پـروتئین هـای غـشای داخلـی و پلـی تایپیک شیگلا محسوب می گردد. پـروتئین MxiA در پایـداری سیـستم ترشحی نوع III و انتقـال عوامـل بیمـاری زا بـه درون سیتوپلاسـم سـلول پوششی میزبان نقش حیاتی بر عهده دارد. سـلول هـای شـیگلا کـه دارای نقص در ژن mxiA هستند در مدل هـای حیـوانی قـدرت بیمـاری زایـی پایین تری از خود نشان مـی دهنـد، بنـابراین، جهـش در ژن mxiA مـی تواند به عنوان یکی از عوامل کاهش بیمـاری زایـی در ایجـاد سـویه هـای واکسنی تخفیف حدت یافته مطرح باشد(۱۰،۱۱).

تکنیک پاساژ های متوالی و جهش زایی با استفاده از مواد شمیایی از جمله اولین روش هایی بود کـه بـه منظـور ایجـاد تخفیـف حـدت در بـاکتری و ویروس های بیماری زا مورد استفاده قرار گرفت. یکی از مهمتـرین معایـب این روش ها عدم اختصاصیت آنها بود، به همین دلیل توسط تکنیک هـای پیشرفته تر مهندسی ژنتیک جایگزین گردیدند. یکی از تکنیک های نـسبتاً جدید در مهندسی ژنتیک که در سال های اخیر مـورد توجـه قـرار گرفتـه است، سیستم نوترکیبی Red (فاژ لامبدا) در باکتری هـا مـی باشـد(۱۴-۱۲). اساس این تکنیک بر مبنای نوترکیبی هومولوگ استوار اسـت. وکتـور های مورد استفاده در ایـن تکنیـک از ژن هـای bet، exo و gam از فـاژ لامبدا تشکیل شده است که از طریق پروموتور القاپذیر آرابینوز کنترل مـی گردند(۱۸-۱۵).

با توجه به بیماری زایی و شیوع نسبتا بالای شیگلوز در کشورهای در حـال توسعه و ناموفق بودن روشهای درمان آنتی بیوتیکی در درمان این بیماری، اهمیت پیشرفت روش های پـیش گیرانـه ماننـد واکـسیناسیون افـراد، بـه خـصوص کودکـان، در اولویـت سـازمان بهداشـت جهـانی (WHO) قـرار دارد(۱۳، ۱۹). با توجه به شیوع نسبتا بالای شیگلوز به خصوص در منـاطق گرمسیری، مطالعه در مورد راه های پیشگیری و مبارزه با شیگلوز از جملـه تهیه واکسن های تخفیف حدت یافته می تواند از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. در حال حاضر یکی از موثرترین نوع واکـسن هـا، سـاخت سـویه های مهاجم تخفیف حدت یافته است، که اثرات بـالینی قابـل قبـولی را در مدل های حیوانی از خود نـشان داده اسـت. در ایـن تحقیـق بـا توجـه بـه اهمیت و نقش ژن mxiA، ایـن ژن بـه عنـوان ژن کاندیـدا جهـت ایجـاد گسستگی (حذف) به منظور ایجاد سویه بومی زنـده تخفیـف حـدت یافتـه (کاندید واکسنی) انتخاب گردید.

مواد و روش ها

سویه های باکتریایی از بیماران مبـتلا بـه اسـهال باسـیلی (مـشکوک بـه شیگلوز) از بیمارستان های میلاد، حضرت علی اصغر (ع) و نیز مرکز طبـی کودکان در شهر تهران که در طی سال هـای ۸۵ تـا ۸۹ جمـع آوری شـده بود، به دانشگاه بقیه الله (عج) منتقل گردید. سپس فرآیند جداسازی بـرای طی مراحل خالص سازی از سویه شیگلا دیسانتری انجام گردید.

نمونـه هـا ابتـدا در محـیط سـالمونلا – شـیگلا آگـار(Salmonella-Shigella Agar)، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شـده و بـه مدت ۱۸ ساعت گرمادهی انجام گردید. به منظور افـزایش دقـت در حفـظ نمونه ها، از نمونه های مشکوک به شیگلا که دچار ناخالصی بودند، پـس از ارزیابی های اولیه ریخت شناسی (Morphology)، مجدداً به محیط مـولر آگار (Mueller Agar) منتقل گردیدنـد. سـپس از کلـونی هـای حاصـل برای تشخیص نمونه های مثبت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

باکتری های مثبت اولیه پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در محیط هینتـون آگار (Hinton Agar)، توسط آزمون های بیوشیمیایی شامل محیط هـای مک کانکی، زایلوز لایزین دکربوکـسیلاز، اورنیتـین دکربوکـسیلاز، آزمـون تخمیـر قنـد آرابینـوز، TSI، ONPG و تـست انـدول شناسـایی و تاییـد گردیدند. به منظور تاییـد صـحت نهـایی آزمـون هـای فـوق آزمـون هـای سـروتایپینگ بـا اسـتفاده از آنتـی سـرم هـای اختـصاصی جـنس شـیگلا (شرکت Mast، انگلستان) به روش آگلوتیناسـیون بـر روی اسـلاید انجـام گردید. در نهایت نمونه های مثبت به محیط کشت LB مـایع منتقـل و بـا افزودن گلیسرول (غلظت نهـایی۲۰٪) در دمـای ۸۰- درجـه سـانتی گـراد ذخیره تهیه گردید(۱۱).

بـه منظـور شناسـایی سـروتیپ شـیگلا جـدا شـده بـا PCR یـک جفـت آغـازگر اختـصاصی بـرای تـشخیص حـضور ژن زیـر واحـد A شـیگا توکسین (StxA) بـا توجـه بـه اطلاعـات موجـود در بانـک ژنـی (شـماره دسترسـی NC_007606) بـا اسـتفاده از نـرم افـزارviewer CLC sequence طراحـی و سـپس سـنتز گردیـد(سـینا کلـون، ایـران). تـوالی آغـازگر هـای بالادسـت و پـایین دسـت تـشخیص ژن زیـر واحد A شیگا توکسین در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول۱. توالی آغازگرهای خارجی (External) به کارگرفته شده در تایید رخداد تبادل آللی و ایجاد حذف در ژن mxiA.

نام آغازگر	توالی آغازگر از ˚۵ به ˚۳
Stx Forward	5' CTCGACTGCAAAGACGTATG 3'
Stx Reverse	5' TCAGGCAGGACACTACTCAA 3'

برای استخراج DNA کروموزومی سوش باکتری شیگلا دیسانتری در محیط LB مایع کشت داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در گرم خانه شیکر دار با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمادهی گردید. ژنوم باکتری با استفاده از کیت تخلیص ژنومی AccuPrep (کره جنوبی، BioNEER) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید و سپس برای تایید ژن زیر واحد A شیگا توکسین و mxiA توسط PCR مورداستفاده قرار گرفت.

DNA حاصل به کمک واکنش PCR، تکثیر شد. واکنش PCR به منظور تکثیر DNA در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۸ میکرولیتر از هر آغازگر (با غلظت ۱۰پیکومول)، ۱میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتید های dNTP (با غلظت۰/۲ میلی مول) و ۰/۲۵ میکرولیتراز آنزیم DNA Taq پلی مراز، ۲/۵ میکرولیتر از بافر ۱۰x ، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (با غلظت نهایی۲ میلی مولار) و ۵۰ نانوگرم از DNA (با غلظت نهایی ۲۵۳ میکروگرم در هر میلی لیتر) تهیه شده بود. چرخه های PCR شامل مرحله واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و دوره سه مرحله ای شامل واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل سازی قطعه مورد نظر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۵ ثانیه و در پایان، مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶ دقیقه می باشد. این سه مرحله، ۳۰ سیکل تکرار می شوند. محصول PCR پس از رنگ آمیزی در اتیدیوم بروماید (با غلظت نهایی ۲۵ میکروگرم در هر میلی لیتر) بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ به کمک نشانگر وزن مولکولی DNA مورد تایید قرار گرفت.

با توجه به اینکه در تکنیک به کار گرفته شده در این تحقیق، لازم است در آغاز سویه های تایید شده نسبت به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین با غلظت نهایی (۸۰ میکروگرم در میلی لیتر) و کلرامفنیکل (۳۲ میکروگرم در میلی لیتر) حساس باشند، لذا نسبت به ارزیابی حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های شیگلا دیسانتری تیپ ۱، اقدام شد. به این منظور، از محیط LB آگار حاوی غلظت های فوق الذکر تهیه و نمونه های باکتری به صورت یک دست و یکنواخت بر روی محیط LB آگار، کشت و به مدت ۱۶ ساعت انکوبه گردید.

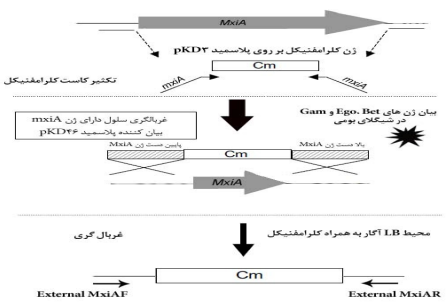
به منظور تکثیر ژن mxiA دستور العمل PCR مطابق مرحله قبل، اجرا گردید با این تفاوت که مدت زمان طویل سازی برای آنزیم Taq پلی مراز ۴۵ ثانیه و برای آنزیم pfu پلی مراز (۲ دقیقه و ۲۰ ثانیه) در نظر گرفته شد. دمای اتصال آغازگر ها برای هر دو آنزیم ۵۵ درجه سانتی گراد انتخاب گردید. آغازگر های بالادست و پایین دست ژن mxiA با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژنی (شماره دسترسی 1NC_007607.) طراحی و سنتز گردید (سینا کلون، ایران). توالی آغازگر های بالادست و پایین دست در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول۲. توالی آغازگرهای خارجی (External) به کارگرفته شده در تایید رخداد تبادل آللی و ایجاد حذف در ژن mxiA.

نام آغازگر	توالی آغازگر از ˚۵ به ˚۳
MxiA Forward	TGGTGATAGTCTGGCTGTAG 3' 5'
MxiA Reverse	3' 5' AGGAATCTGAGAGACCAATC

یاخته مستعد الکتریکی از شیگلا تهیه و سپس به منظور انجام تراریختی ۴۰ میکرولیتر از یاخته مستعد الکتریکی با ۱ میکرولیتر از پلاسمید pKD46 در درون کووت ۰/۲ سانتی متری بر روی یخ مخلوط و دستگاه الکتروپوریتور (BIORAD,USA) در ولتاژ ۲/۵ کیلوولت، میدان مغناطیسی ۲۵ میکروفاراد و مقاومت ۲۰۰ اهم تنظیم و عمل الکتروترانسفورم انجام گردید، سپس بلافاصله ۱ میلی لیتر از محیط LB مایع به مخلوط اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه در گرمخانه همراه با همزن با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه گرمادهی انجام شد در ادامه بر روی محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) غربالگری صورت گرفت. لازم به ذکر است در مورد نمونه شاهد به جای DNA پلاسمیدی، از آب دوبار تقطیر استفاده شد. به منظور ارزیابی کارایی تراریختی انجام شده، از دو مقدار پلاسمید تخلیص شده pKD46 به میزان ۱ و ۱۰ میکرولیتر با غلظت یکسان (۳۵ نانوگرم در میکرولیتر)، به یاخته مستعد الکتریکی اضافه و عمل تراریختی انجام و سپس به منظور کمی کردن نتایج، Transformation efficiency از تقسیم تعداد کلونی های رشد کرده در محیط آنتی بیوتیکی به مقدار DNA (میکروگرم در میلی لیتر) محاسبه شد.

به منظور تکثیر کاست حامل ژن کلرامفنیکل (cat) آغازگر های طویل ۶۶ نوکلئوتیدی طراحی گردید. بیست و یک نوکلئوتید از آغازگر های طراحی شده با جایگاه شروع (P1 و P2) بر روی پلاسمید pKD3 مشابه و مابقی نوکلئوتید ها با دو طرف ژن mxiA (خارج از ژن و چسبیده به ابتدا و انتهای آن) دارای تشابه بودند (شکل ۱). واکنش PCR به منظور تکثیر DNA در حجم ۱۰۰ میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر از هر آغازگر (غلظت جفت آغازگرها ۱۰ میلی مولار)، ۱ میکرولیتر (۴۰ میلی مولار) از مخلوط نوکلئوتید های dATP، dCTP، dGTP و dTTP، ۱ میکرولیتر از آنزیم DNA پلی مراز HF (High Fidelity PCR Mix، فرمنتاز)، ۱۰ میکرولیتر از بافر 10x، $MgCl_2$ به همراه بافر بود، ۱ میکرولیتر از DNA پلاسمیدی pKD3 (با غلظت ۹۵ میکروگرم در هر میلی لیتر) تهیه شده، بود.



شکل۱. استراتژی روش Recombineering به منظور ایجاد تداخل در ژن mxiA.

چرخه های PCR شامل مرحله واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و ۳۲ دوره سه مرحله ای شامل واسرشته شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگر به رشته الگو در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طویل سازی قطعه مورد نظر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و در پایان، مرحله طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ با کمک نشانگر وزن مولکولی DNA مورد تایید قرار گرفت و سپس با استفاده از کیت (Gel Purification kit ,QIAGEN، آمریکا) به منظور انجام تراریختی، خالص سازی گردید. آغازگر های طراحی شده به منظور تکثیر کاست آنتی بیوتیکی کلرامفنیکل در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول۳. توالی آغازگرهای خارجی (External) به کارگرفته شده در تایید رخداد تبادل آللی و ایجاد حذف در ژن mxiA.

نام آغازگر	توالی آغازگر از ً۵ بهً ۳
Cassette MxiAF	ATGAAAGTGATCCAGTCTTTTCTTAAGCAAGTAA GTACTAAGCCTGTGTAGG 3´CTGGAGCTGCTTCG
Cassette MxiAR	TAAATAGTCTTCAATACATTAATGGTATATGCTT CATCAATCTACATATGAA TATCCTCCTTAGT 3´

باکتری شیگلا دیسانتری حامل پلاسمید pKD46 در ۵۰ میلی لیتر از محیط SOB واجد آنتی بیوتیک آمپی سیلین (با غلظت نهایی ۱۰۰ میکرولیتر در میلی لیتر) و L- آرابینور (با غلظت نهایی ۱۰ میلی مولار) مخلوط گردید و در دمای ۳۰ درجه گرمادهی انجام گرفت، پس از رسیدن تراکم سلولی به ۰/۶ (OD) مطابق دستورالعمل مرحله قبل، یاخته مستعد الکتریکی تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن با ۱۰ میکرولیتر از کاست آنتی بیوتیکی کلرامفنیکل در کووت ۰/۱ مخلوط و مطابق با مرحله قبل، با این تفاوت که از ولتاژ ۱/۸ کیلو ولت استفاده شد، شوک الکتریکی انجام گردید.سپس به مخلوط پس از شوک الکتریکی به میزان ۱ میلی لیتر از محیط SOB مایع بدون آنتی بیوتیک اضافه و در گرمخانه به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه به همراه همزن با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه گرمادهی گردید و سپس ۵۰ میکرولیتر از باکتری های الکتروترانسفورم شده به محیط حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل (۳۲ میکرگرم در میلی لیتر) منتقل و غربالگری انجام شد. در مورد نمونه شاهد مطابق مرحله قبل عمل شد.

به منظور تایید انجام نوترکیبی آغازگر های خارجی در محدوده ۵۰۰ نوکلئوتید در بالادست (۵۱۳ جفت باز) و پایین ‹bp ۶۲۲ ‹جفت باز› ژن mxiA بدون جایگاه برش آنزیمی و با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژنی با استفاده از نرم افزار CLC (version 6) طراحی و سنتز شد (جدول۴).

جدول۴. توالی آغازگرهای خارجی (External) به کارگرفته شده در تایید رخداد تبادل آللی و ایجاد حذف در ژن mxiA.

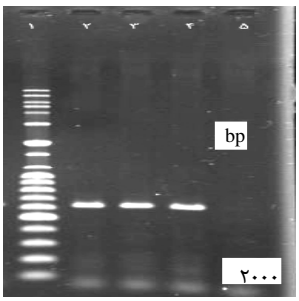
نام آغازگر	توالی آغازگر از ً۵ بهً ۳
External MxiAF	GATCTTACTGCTGAACAAG
External MxiAR	TTCCAATCAGGCTTAATATC

واکنش PCR مطابق دستور العمل ارائه شده جهت تکثیر ژن mxiA اجرا گردید با این تفاوت که از کلونی های مقاوم به کلرامفنیکل که موبد قرار گیری کاست آنتی بیوتیکی در ژنوم باکتری می باشد (سنجش فنوتیپی)، به عنوان DNA الگو و نیز با انتخاب دمای اتصال آغازگر ها در ۵۶ درجه سانتی گراد انتخاب شد و سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و صحت انجام نوترکیبی مورد تایید قرار گرفت. به منظور تایید صحت فرآیند فوق محصول PCR مورد نظر پس از خالص سازی، برای انجام توالی یابی به شرکت (BioNEER، کره جنوبی) فرستاده شد.

یافته ها

از مجموع ۴۸ سویه شیگلا دیسانتری جمع آوری شده نتایج آزمایش های بیوشمیایی صحت جنس سویه های شیگلا را تایید نمود. از این مجموع، ۱۹ سویه مربوط به بیمارستان میلاد، ۱۱ سویه مربوط به بیمارستان حضرت علی اصغر (ع) و ۱۸ سویه مربوط به مرکز طبی کودکان بودند. از این تعداد ۲۹ مورد جنس مذکر و مابقی (۱۹ مورد) مونث بودند. نتایج آزمایش های سرولوژی گونه دیسانتری را در تمام نمونه هایی که از نظر بیوشمیایی مثبت بودند را تایید نمود. از مجموع ۴۸ سویه شیگلا دیسانتری، ۴۵ سویه (۹۳/۷۵٪) به آمپی سیلین و ۲ سویه (۴/۱۷٪) نسبت به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل مقاوم بودند. از سویه حساس به هر دو آنتی یوتیک به عنوان سویه کاندیدا به منظور انجام باقی مراحل بر روی آن انتخاب گردید.

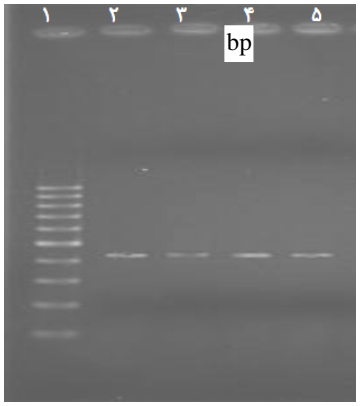
حضور ژن زیر واحد A شیگا توکسین با انجام روش PCR و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ مشخص گردید که در شکل ۲ نشان داده شده است. محصول مورد انتظار برای ژن stxA، ۶۲۲ جفت باز می باشد که در مورد سویه کاندید (حساس به آمپی سیلین و کلرامفنیکل) به وضوح قطعه مورد نظر مشاهده شد. نتایج نشان داد که از مجموع ۴۸ سویه شیگلا دیسانتری، ۳ سویه از جهت سروار، متعلق به نوع یک (type 1) می باشند.



شکل ۱

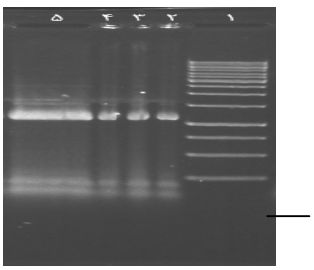
شکل ۲) الکتروفورز محصول PCR تشخیص ژن زیر واحد A شیگا توکسین روی ژل آگاروز ۱/۵٪. ۱) نشانگر وزن مولکولیDNA ۶۲۲ bp (کره جنوبی، BioNEER)، ۲) محصول PCR ژن زیر واحد A شیگا توکسین در باکتری شماره ۱ (قطعهbp ۶۲۲)، ۳) محصول PCR ژن زیر واحد A شیگا توکسین در باکتری شماره ۲ (قطعهbp ۶۲۲)، ۴) محصول PCR ژن زیر واحد A شیگا توکسین در باکتری شماره ۳ (قطعهbp ۶۲۲)، ۵) محصول PCR سویه شیگلا فلکسنری 2b (ATCC 12022) به عنوان کنترل منفی.

جهت تایید حضور ژن mxiA از طریق PCR، آغازگر های شناسایی ژن mxiA طراحی گردید، این آغازگرها طولی معادل ۴۱۲ جفت باز از ژن mxiA تکثیر می کنند. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود، قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با قطعه مورد نظر از ژن هدف ما هم خوانی دارد (قطعه bp ۴۱۲). نتایج تعیین توالی تشابه کامل (۱۰۰٪) ژن mxiA را با شیگلا دیسانتری استاندارد با شماره دسترسی(CP000035) در پایگاه داده های ژنومی (NCBI) نشان داد.



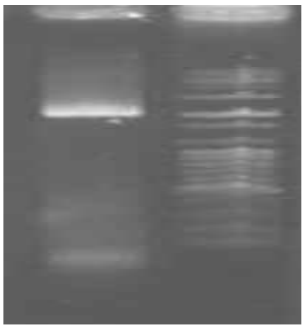
شکل ۳. الکتروفورز محصول PCR تشخیص ژن mxiA بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪) نشانگر وزن مولکولیDNA bp ۱۰۰ (آلمان، فرمنتاز)، ۲) محصول PCR ژن mxiA در باکتری شماره ۱ (قطعه ۴۱۲ bp) با استفاده از آنزیم DNA پلی مراز Pfu در دمای ۵۴ درجه سانتی گراد، ۳) محصول PCR ژن mxiA در باکتری شماره ۲ (قطعه۴۱۲ bp) با استفاده از آنزیم DNA پلی مراز Pfu در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد،۴) محصول PCR ژن mxiA در باکتری شماره ۱ (قطعه۴۱۲ bp) با استفاده از آنزیم DNA پلی مراز Taq در دمای ۵۴ درجه سانتی گراد،۵) محصول PCR ژن mxiA در باکتری شماره ۱ (قطعهbp ۴۱۲) با استفاده از آنزیم DNA پلی مراز Taqدر دمای۵۵ درجه سانتی گراد.

نتایج محاسبات کمی حاصل از تراریختی باکتری شیگلا توسط پلاسمید pKD46 نشان داد که با افزایش مقدار پلاسمید (غلظت ثابت) از ۱ به ۱۰ میکرولیتر، کارایی تراریختی به میزان تقریباً ۱۰ برابر افزایش می یابد. در ادامه واکنش تکثیر کاست آنتی بیوتیکی کلرامفنیکل با استفاده از پلاسمید pKD3 اجرا گردید. حضور قطعه ۱۱۰۳ جفت بازی، تکثیر کاست کلرامفنیکل (ژن cat) را با استفاده از آغازگر های طویل ۶۶ نوکلئوتیدی (شامل۲۰ نوکلئوتید ناحیه آغازگر بر روی پلاسمید pKD۳+ ۴۶ جفت باز ناحیه هومولوگ با ژن mxiA در پلاسمید تهاجمی شیگلا دیسانتری) نشان می دهد (شکل ۴).



شکل ۴. الکتروفورز محصول PCR کاست کلرامفنیکل. ۱) نشانگر وزن مولکولیKb DNA ۱ (آلمان، فرمنتاز)، ۲ الی۱۰) تشکیل قطعه ۱۱۰۳ جفت بازی، تکثیر کاست آنتی بیوتیکی کلرامفنیکل را نشان می دهد.

پس از انجام تراریختی کاست کلرامفنیکل در حامل شیگلا (pKD46+)، کلونی های مقاوم به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل بر روی پلیت حاوی کلرامفنیکل (۳۲ میکروگرم در میلی لیتر) به وضوح مشاهده شد. به منظور تایید صحت وقوع نوترکیبی صحیح در جایگاه مورد انتظار بر روی پلاسمید تهاجمی شیگلا دیسانتری واکنش PCR با استفاده از آغازگر های خارجی (External) انجام گردید. همانطور که در شکل مشاهده می گردد حضور قطعه ۲۱۲۷ جفت بازی نشان دهنده صحت رخداد نوترکیبی بین کاست آنتی بیوتیکی با ژن mxiA را نشان می دهد. نتایج حاصل از توالی یابی صحت وقوع نوترکیبی در جایگاه مورد نظر را تایید نمود. قطعه تکثیر شده در واقع شامل نواحی بالادست ژن mxiA (۵۱۳ جفت باز) + کاست کلرامفنیکل (۱۱۰۳ جفت باز) + ناحیه پایین دست ژن mxiA (۵۱۱ جفت باز) می باشد.



شکل ۵. الکتروفورز محصول PCR با آغازگر های خارجی به منظور تایید نوترکیبی در سویه جهش یافته شیگلا دیسانتری ۱) نشانگر وزن مولکولی DNA ۱Kb کره جنوبی، BioNEER)، ۲) قطعه ۲۱۲۷ جفت بازی نشان دهنده انجام رخداد صحیح نوترکیبی هومولوگ کاست آنتی بیوتیکی با ژن mxiA می باشد.

بحث

تا کنون تلاشهای بسیار زیادی جهت تولید یک واکسن ایمن و موثر برعلیه عامل بیماری شیگلوز در جهان صورت گرفته است. ولی هیچ کدام از آنها به دلایل مختلفی از جمله : عدم تحریک مناسب ایمنی مخاطی، ایمن نبودن در کودکان، پیچیده بودن روند تولید واکسن و گران بودن مجوز استفاده در حجم وسیع و عمومی را دریافت نکرده اند و گاهی مصرف آنها به یک کشور خاص و در گروه سنی خاصی محدود شده است. یکی از مهمترین راهکارهای تولید واکسن علیه شیگلوز تولید واکسن های زنده تخفیف حدت یافته می باشد زیرا این واکسن ها علاوه بر داشتن مصرف خوراکی، توانایی بالایی در تحریک سیستم ایمنی مخاطی و فعال کردن شدید سیستم ایمنی دارا هستند(۱۹).

میترت و همکاران در سال ۱۹۸۴ سویه جهش یافته T32-ISTRATI را با استفاده از تکنیک پاساژ متوالی در شیگلا فلکسنری 2a ایجاد نمودند. این کاندید واکسنی بعد 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(۲۰). ونکاتسن و همکاران در سال ۱۹۹۰ سویه کاندید واکسنی T32-ISTRATI را از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی ارزیابی نمودند. ارزیابی ها حاکی از حذف سه لکوس(mxiA (invA وIpaABCD، virG در پلاسمید تهاجمی شیگلا بود. همچنین کاندید واکسنی شیگلا فلکسنری 2a وابسته به استرپتومایسین (SmD) نیز با روشی مشابه که در ساخت T32-ISTRATI به کار رفت، در سال ۱۹۷۲ ایجاد شد. تکنیک پاساژ متوالی معایبی همچون عدم اختصاصیت، برگشت پذیری به نوع وحشی و ناپایداری ژنتیکی را دارد، بنابراین به منظور ایجاد جهش اختصاصی و هدفمند در باکتری مناسب نمی باشد(۲۰،۲۱).

امروزه با پیشرفت روش های مهندسی ژنتیک تکنیک های گوناگونی به منظور ایجاد جهش و گسستگی در ژن ها استفاده می گردد که اکثرا بر مبنای غیر فعال کردن ژن ها از طریق دخول کاست ژنی و یا حذف ژن قرار گرفته است. یکی از مهمترین روش ها، استفاده از پلاسمید های انتحاری می باشد. یوشیکاوا و همکاران در سال ۱۹۹۵ با ایجاد دو جهش در ژن های virG و thyA توانستند سویه تخفیف حدت یافته شیگلا فلکسنری 2a 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(۲۲). سویه کاندید واکسنی (virG, ΔaroAΔ) CVD1203 توسط نورجیا و همکاران در سال ۱۹۹۴ با استفاده از پلاسمید های انتحاری pFJ201، pKTN701 ساخته استفاده از پلاسمید های انتحاری به منظور حذف ژن در باکتری ها دارای معایبی می باشد که از جمله می توان به مواردی مانند بکارگیری پلاسمید های متعدد، هزینه زیاد و زمان بیشتر، تکثیر قطعات مشابه با طول بالا و نیز احتمال از بین نرفتن پلاسمید انتحاری در میزبان مورد نظر اشاره کرد. تکنیکی که در این تحقیق از آن استفاده گردید، تکنیک حذف ژن با استفاده از سیستم نوترکیبی فاژی یا recombineering بود. مزایای این روش نسبت به سایر روش ها شامل سادگی روش، هزینه پایین، افزایش فرکانس نوترکیبی، انتخاب مناطقی مشابه (هومولوژی) کوتاه تر و مهم تر از دیگر موارد، مدت زمان کمتر می باشد. این تکنیک اولین بار توسط داتسنکو و وانر در سال ۲۰۰۰ ابداع گردید اما سپس در سویه های دیگری شامل سالمونلا، سراشیا و یرسینیا گسترش پیدا نمود(۲۳،۱۲).

نتایج حاصل از این روش در دیگر سویه ها نشان داد که یکی از فاکتور های تا ثیرگذار در کاربرد این تکنیک در میزبان های متفاوت، می تواند به اثر سمی بیان فاژ های لامبدا در آنها برگردد. همچنین در این تحقیقات نشان داده شد که افزایش طول کاست آنتی بیوتیکی میزان فرکانس نوترکیبی را افزایش می دهد(۱۸-۱۵). در سال ۲۰۰۶ توسط رنلو و همکاران سویه های جهش یافته ای در ژن های asd، set1A، sen، msbB2، msbB1، T uhP و H9/8 ipa در شیگلا فلکسنری 2a (WRSf2)، ژن های virG و stxAB در شیگلا دیسانتری تیپ۱ (WRSd1) و ژن های virG، sen و ipaB در شیگلا سونه ای (WRSs) ایجاد گردیدند. تکنیک به کار گرفته شده به منظور ایجاد این سویه ها روش recombineering بود. نتایج این تحقیق کارایی این تکنیک را در باکتری شیگلا نشان داد(۱۲،۲۴).

در تحقیق حاضر با توجه به نقش اساسی ژن mxiA در آلودگی میزبان به عنوان اولین ژن هدف در تولید سویه کاندید واکسنی شیگلا دیسانتری انتخاب گردید. در این مطالعه از پلاسمید pKD46 و دستورالعمل داتسنکو و وانر در سال ۲۰۰۰ به منظور تراریختی استفاده گردید. پلاسمید pKD46 پلاسمیدی با توانایی تکثیر پایین می باشد (Low copy number) که توانایی تنظیم بیان دقیق ژن های لامبدا (exo, beta, gam) را به ما می دهد که در مقایسه با پلاسمید pKM208 به کار گرفته شده توسط رانلو و همکاران(۱۲)، اندازه کوچکتری (Kb ۶/۴) دارد و نیز القا پذیری آن از طریق L- آرابینوز می باشد. در این تحقیق آغازگر های با طول کوتاه (۴۶ جفت باز هومولوگ با ژن mxiA) طراحی و استفاده شد. یکی از دلایل کاهش کارایی نوترکیبی احتمالاً می تواند به حذف و یا اختلال در جایگاه های FRT هومولوژی قرار گرفته در دو طرف کاست آنتی بیوتیکی، مربوط شود. قرار گیری غیر اختصاصی جایگاه های FRT هومولوژی در ژنوم شیگلا امکان نوترکیبی اشتباه را افزایش می دهد. در نظر است تا در مطالعات بعدی به مطالعه و ارزیابی قدرت تهاجم سویه تخفیف حدت یافته در سلول های هلا، تجویز خوراکی در حیوان آزمایشگاهی، سنجش پتانسیل در ایجاد ایمنی محافظتی و نیز به عنوان سویه والد در تولید کاندید واکسنی با چندین جهش حذفی اقدام گردد.

شد(۲۲،۲۳). نتایج بالینی این سویه واکسنی در خوکچه هندی و انسان در دوز متوسط (در حدود 10^6 CFU) نشان از تحمل پذیری بالای آن داشت اما در دوز های بالاتر (در حدود 10^8 تا 10^9 CFU) بخشی از دریافت کنندگان به سویه واکسنی واکنش نشان دادند. بنابراین ایجاد تخفیف حدت بیشتر از طریق غیر فعال نمودن مسیر های بیوسنتزی، متابولیکی و نیز توکسینی مورد توجه قرار گرفت. هم چنین علاوه بر CVD1203، (ΔguaBA) CVD1204، Δset, Δsen, ΔguaBA,) ،CVD1205 (ΔvirG, ΔguaBA) 1207 CVD (ΔvirG و (Δset, Δsen, ΔguaBA) CVD1208، بر پایه استفاده از پلاسمید های انتحاری و پدیده تبادل آللی طراحی و ساخته شد. نتایج بالینی سویه های تولید شده نشان دادند که حذف و غیر فعال نمودن این ژن ها ایمنی زایی بالایی را در انسان سبب می گردد(۲۳-۲۱).

نتیجه گیری

سیستم نوترکیبی Red روشی سریع، ارزان، ساده و توانمند می باشد که در مقایسه با روش های پیشین که دارای مهندسی های گسترده و در عین حال وقت گیر بودند بسیار کارا و مقرون به صرفه تر می باشند. این تکنیک با توجه به کارایی بالای آن قادر است در شناسایی ژن های ناشناخته باکتری با عملکرد نامعلوم، شناسایی فاکتور های مستعد بیماری زایی باکتریایی و نیز در تولید واکسن های خوراکی دارای چندین جهش به کار گرفته شود.

REFERENCES

1. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ 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 LD, Sims R, Sack D, Montali RJ, 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 MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR. Molecular evolutionary relationships of entroinvasive Escherichia coli and shigella spp. Infect. Immun. 2004; 72: 5080-5088.

4. Girard MP, Steele D, Chaignat CL, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human enteric infections. Vaccine. 2006; 24: 2732-2750.

5. Bennish ML. Potentially lethal complications of shigellosis. Rev. Infect. Dis.1991; 13: 319–324.

6. Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from Shigella flexneri. Proc. Natl. Acad. USA 1988; 85: 9317-9321.

7. Venkatesan MM, Goldberg MB. Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of Shigella flexneri. Infect. Immun. 2001; 69: 3271-3285.

8. Andrew GP, Hromockyj AE, Coker C, Maurelli AT. Two novel virulence loci, mxiA and mxiB, in Shigella flexneri 2a facilitate excretion of invasion plasmid antigens. Infect. Immun. 1991; 59: 1997-2005.

9. Andrews GP, Maurelli AT. mxiA of Shigella flexneri 2a, which facilitates export of invasion plasmid antigens,encodes a homolog of the low-calcium-response protein, LcrD, of Yersinia pestis. Infect. Immun. 1992; 60: 3287-3295

10. Gala´n JE, Ginocchio C, Costeas P. Molecular and functional characterization of the Salmonella typhimurium invasion gene invA: homology of InvA to members of a new protein family. J.

11. Bacteriol1992; 17: 4338–4349.

12. Farshad S, Sheikhi R, Japoni A, Basiri E, Alborzi A. Characterization of Shigella strains in Iran by plasmid profile analysis and PCR amplification of ipa genes. J. Clin. Microbiol. 2006; 44(8): 2879-83.

13. Ranallo RT, Barnoy S, Thakkar S, Urick T, Venkatesan MM. Developing live Shigella vaccines using lambda red recombineering. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2006; 47: 462-469.

14. Alexander WA, Hartman AB, Oaks EV, Venkatesan MM. Construction and characterization of virG (icsA)-deleted E.coli K12- S.flexnerri hybrid vaccine strains. Vaccine. 1996; 14: 1053-1061.

15. Kotloff KL, Pasetti MF, Barry EM, Nataro JP, Wasserman SS, Sztein MB 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.

16. Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination. Annu. Rev. Genet. 2002; 36: 361-388.

17. Murphy KC. Use of bacteriophage λ recombination functions to promote gene replacement in Escherichia coli. J. Bacterio. 1998; 180: 2063-2071.

18. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci USA 2000; 97: 6640-6645.

19. Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP, Stewart AF. A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli. Nat. Genet. 1998; 20: 123-128.

20. Jennison AV, Verma NK. Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development. FEMS Microbiol. Rev. 2004; 28: 43-58.

21. Meitert T, Pencu E, Ciudin L and Tonciu M. Vaccine strain Sh. flexneri T32-ISTRATI. Studies in animals and volunteers. Antidysentery immunoprophylaxis and immunotherapy by live vaccine VADIZEN (Sh. flexneri T32-ISTRATI). Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol. 1984; 43: 251–278.

22. Venkatesan, MM, Fernandez-Prada C, Buysse JM, Formal SB and Hale TL. Virulence phenotype and genetic characteristics of the T32-ISTRATI Shigella flexneri 2a vaccine strain. Vaccine. 1991; 9: 358–363.

23. 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.

24. Serra-Moreno R, Acosta S, Hernalsteens JP, Jofre J, Muniesa M. Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. BMC Mol Biol. 2006; 31: 1-12.

25. Noriega FR, Wang JY, Losonsk YG, Maneval DR, Hone DM, Levin MM. Construction and Characterization of Attenuated AaroA AvirG Shigella flexneri 2a Strain CVD 1203, a Prototype Live Oral Vaccine. Infect. Immun. 1994; 62: 5168-5172.