ساخت سازه ژنی جهش یافته (pGEM-7zf::ΔicsA(Cat^r برای تولید سویه تخفیف حدت یافته شیگلا فلکسنری2a

محمد دورودیان[1]، مجتبی سعادتی[2*]، آرش قهرودی[3] ، سید مصطفی حسینی[4]، دانیال جهان تیغ[3]، احمد رضا صالحی[3] محمدافتخاری[5]

1. کارشناسی ارشد سلولی و ملکولی، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
2. دکتری باکتری شناسی، استاد گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)،تهران، ایران
3. کارشناسی ارشد سلولی و ملکولی، گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)،تهران، ایران
4. باشگاه پژوهشگران جوان، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
5. کارشناسی ارشد سلولی و ملکولی، پژوهشگر مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

*** نشانی برای مکاتبه :** تهران، اتوبان شهید بابایی، دانشگاه جامع امام حسین(ع)،گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی
نمابر:77104835- 021 ، تلفن: 77105658 -021، saadati_m@yahoo.com

دریافت مقاله: تیر نود و یک پذیرش برای چاپ: مهر نود و یک

چکیده

سابقه و هدف: *بیماری شیگلوز عامل مسری ترین بیماری اسهال حاد در جهان است و ژن icsA نقش کلیدی را در بیماری زایی باکتری شیگلا ایفا می کند. هدف این مطالعه، هم سانه سازی ژن icsA و ساخت سازه جهش یافته (pGEM-7zf::ΔicsA(Cat^r به منظور القای نوترکیبی در سویه شیگلا بومی با هدف ساخت سویه کاندیدای واکسن زنده تقلیل حدت یافته است.*

روش کار: *گونه و سروتایپ شیگلای جدا شده با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی، آزمایش سرم شناسی و واکنش زنجیر های پلیمراز (PCR) تأیید شد. آغازگرهای درون ژنی و اختصاصی ژن ΔicsA طراحی گردید، سپس ΔicsA در حامل pGEM-7zf هم سانه سازی و تعیین توالی گردید. بر اساس نقشه برش آنزیمی، ژنΔicsA به وسیله آنزیم محدود گر EcoRV برش داده شد، سپس یک ژن مقاومت آنتی بیوتیکی کلرامفینیکل در جایگاه برش هم سانه سازی گشت.*

یافته ها: *سویه شیگلا فلکسنری2a با آزمایش سرم شناسی و PCR مورد تأیید قرار گرفت. توالی ژن icsA سویه بومی با سویه های ثبت شده در بانک ژنی به لحاظ ترادف ژنی یک سان بود. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صحت ساخت سازه pGEM::ΔicsA(Cat^r) تائید گشت.*

نتیجه گیری: *استفاده از تکنیک تبادل آللی بر پایه بهره گیری از رخ داد نوترکیبی در باکتری ها یکی از موثرترین روش های ایجاد حذف ژنی هدف مند می باشد. این ساختار جهش یافته می تواند به منظور ایجاد سویه کاندیدای واکسن زنده تقلیل حدت یافته شیگلا فلکسنری2a مورد استفاده قرار گیرد.*

واژگان کلیدی: ***شیگلا فلکسنری2a، ژن icsA ، تبادل آللی، واکسن زنده تقلیل حدت یافته.***

مقدمه

باکتری شیگلا باسیل گرم منفی روده ای است و عامل مسری ترین اسهال باسیلی، شیگلوز، در جهان است. جنس شیگلا شامل چهار گونه دیسانتری، فلکسنری، سونه ای و بویدی می باشد(۱،۲). شیگلوز با تظاهراتی شامل اسهال آبکی به هم راه مقادیر مختلفی از مخاط و خون، درد، دل پیچه، تب، تهوع، سردرد و گرفتگی عضلات دیده می شود. جنس شیگلا از نظر ژنتیکی بسیار شبیه اشریشیاکلی است که گاهی از آن به عنوان اشریشیاکلی بیماری زا یاد می شود(3). عفونت شیگلا بیشتر از طریق آب و غذای آلوده منتقل می شود البته گزارش هایی نیز در مورد انتقال با حشرات وجود دارد. کودکان زیر 5 سال و افرادی که به مناطق آلوده سفر می کنند بیشتر در معرض خطر هستند. تقریبا 10 تا 100 عدد باکتری برای ایجاد بیماری کافی است(4). شیگلا فلکسنری2a به عنوان یک سروتایپ غالب در برخی از کشورها مطرح است(5). درمناطق آسیای جنوب شرقی به استثنای تایلند، سویه شیگلا فلکسنری با فراوانی 68٪ بالاترین نرخ را در میان دیگر سروارها دارد(۶،۷). سرو تایپ های شیگلا فلکسنری از پراکندگی و نرخ شیوع متفاوتی از یک ناحیه به ناحیه ای دیگر و یا حتی از یک سال به سال دیگر برخوردار است، با این وجود؛ سروتایپ غالب جداشده از میان مبتلایان به شیگلوز در کشورهای در حال توسعه شیگلا فلکسنری می باشد. برای مثال؛ در کشور بنگلادش سرو تایپ شیگلا فلکسنری2a به تنهایی 27٪ از کل موارد ابتلا به عفونت شیگلا را به خود اختصاص داده است(8).

در بزرگ سالان بیماری معمولا بهبود می یابد ولی در کودکان و خردسالان بیماری شدید ایجاد می شود که نیاز به بستری در بیمارستان و حتی در مواردی منجر به مرگ و میر می شود(9). تقریبا 99% عفونت های شیگلا در مناطق در حال توسعه رخ می دهد و سالانه حدود 1/1 میلیون نفر از عفونت شیگلا می میرند که 60% آنها کودکان زیر 5 سال هستند(10). درمان با آنتی بیوتیک اصلی ترین راه درمان شیگلوز است اما مقاومت روزافزون نسبت به آنتی بیوتیک ها و از طرف دیگر نرخ بالای عفونت و مرگ ومیر در کودکان و هم چنین قابلیت استفاده از این باکتری در بیوتروریسم ضرورت ساخت یک واکسن مؤثر علیه گونه های مختلف شیگلا را ایجاب می کند(11).

شیگلا ناحیه راست روده و کلون را در دستگاه گوارش هدف قرار می دهد، در آنجا باکتری وارد سلول های تخصص یافته M مستقر در فولیکول های مرتبط با سلول های پوششی روده می شود. باکتری سپس از طریق اندرکنش هایی بین پروتئین های باکتری و برخی مولکول های پیام رسان میزبان به سلول های پوششی روده ای مجاور حمله می کند(۱۲،۱۳). هر باکتری نهایتاً درون یک واکوئل اندوسیتوزی بلعیده می شود و پاره شدن واکوئل باعث رها شدن باکتری درون سیتوپلاسم سلول پوششی می شود و در آنجا تکثیر شده و به کمک پروتئین حرکت درون سلولی IcsA ، به سمت سلول های پوششی مجاور حرکت می کند(14-16).

پروتئین IcsA که یک پروتئین حیاتی برای بیماری زایی باکتری است، متعلق به خانواده اتوترانسپورترهای نوع 4 است. درون سلول میزبان IcsA با پروتئین سندروم عصبی ویسکوت الدریچ (N-WASP) میزبانی وارد واکنش می شود. این پروتئین یک پروتئین تنظیم کننده اکتین سلولی است و به نوبه خود کمپلکس Arp2/3 میزبان را آزاد می کند و موجب پلیمریزه شدن اکتین های گلوبولی میزبان به شکل اکتین رشته ای می شود. تجمع اکتین رشته ای به صورت "دنباله هایی" در یک قطب سلول موجب حرکت مبتنی بر اکتین باکتری (ABM) می شود(۱۱،۱۷،۱۸).

گسترش درون سلولی و بین سلولی مبتنی بر icsA باکتری به شدت باعث از دست رفتن سلامت سلولی و به وجود آمدن آسیب بافتی می شود. سلول های شیگلا که دارای نقص در ژن icsA هستند در تمام مدل های حیوانی قدرت بیماری زایی کمتری دارند(17) و جریان لوکوسیت های پلی مورفونوکلئار نهایتا باکتری ها را می کشد و عفونت از بین می رود. بنابراین جهش در ژن icsA محور اصلی کاهش بیماری زایی در چندین سویه واکسن تقلیل حدت یافته است(10).

آزمایش های بالینی انجام گرفته بر روی سویه های متنوع واکسنی تخفیف حدت یافته نشان داده اند که تولید این نسل های واکسنی توانایی عرضه بالاترین میزان آنتی ژن به سیستم ایمنی مخاطی را دارا هستند و در عین حال بالاترین میزان برانگیختگی را در سیستم ایمنی بدن ایجاد خواهند نمود. امروزه سویه های واکسنی تهاجمی عموماً به وسیله تخفیف حدت از طریق جهش زایی در ژن های بیماری زایی که پس از ورود باکتری به سلول های بدن برای بیماری زایی باکتری ضروری می باشند انجام می گیرد(19).

کاتلاف و هم کاران سویه واکسنی CVD1207 را از طریق ایجاد جهش اختصاصی در ژن های icsA ، sen، set و guaBA تولید نمودند(20). جهش زایی در ژن های بیماریزا شیگلا مانند icsA ،ipaB و غیره یا طیفی از ژن های متابولیسمی مانند ژن های مسیر بیوسنتزی پورین ها این پتانسیل را دارا هستند که واکسن های ایمن و تا 100 درصد محافظ در برابر شیگلوز ایجاد نمایند (۱۱،۱۸،۲۱). تاکنون چندین سویه واکسنی بر پایه حذف ژن icsA از گونه های مختلف شیگلا ساخته شده است که می توان به سویه های واکسنی SC602 (شیگلا فلکسنری2a)، WRSS1 (شیگلا سونه ای) و WRSd1 (شیگلا دیسانتری تیپ1) اشاره کرد (۹،۱۲،۱۷،۲۲،۲۳).

هدف این مطالعه، طراحی و ساخت یک ساختار جهش یافته از ژن icsA در یک سویه شیگلا بومی است که بتوان از آن در برنامه های توسعه واکسن علیه شیگلوز بر مبنای سویه بومی استفاده نمود. به این منظور ژن icsA از سویه شیگلایی که قبلاً در بیمارستان طالقانی از یک بیمار ایرانی جدا شده بود استفاده شد.

روش کار

در ابتدا، باکتری شیگلا فلکسنری2a از بیماران مبتلا به اسهال خونی در بیمارستان طالقانی، جدا شد. نمونه های تهیه شده، با استفاده از سوآپ های استریل در محیط سالمونلا- شیگلا آگار، در دمای 37 درجه سانتی گراد کشت و به مدت 16 ساعت گرماگذاری شد. سپس نمونه ها توسط آزمون های بیوشیمیایی؛ اورنیتین دکربوکسیلاز، هکتوئن، زایلوز لایزیندکربوکسیلاز، مک کانکی، TSI ، ONPG، آزمون تخمیر قند آرابینوز و تولید اندول شناسایی و پس از کشت در محیط LB مایع و افزودن گلیسرول(غلظت نهایی15٪) در دمای 80- درجه سانتی گراد ذخیره شد. جداسازی سویه باکتریایی با هماهنگی مسئول بخش بیماری های ناشی از مواد غذایی بیمارستان طالقانی انجام گرفت.

سویه های شیگلای جدا شده از بیماران پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی، با استفاده از کیت تشخیصی منوکلونال سروتایپ گونه شیگلا فلکسنری2a (انگلستان ,Mast Assure) تأیید شد. برای این منظور ابتدا سویه های شیگلا بر روی محیط مک کانکی آگار کشت داده شد و سپس آزمایشات شناسایی گونه با استفاده از روش آگلوتیناسیون بر روی شیشه اجرا گردید. بعلاوه، سوش های جمع آوری شده بعداز تائید با آنتی سرم تک ظرفیتی بوسیله آغازگرهای PAIF, PAIR تائید گردید(24). آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق با نرم افزار Allel ID6 طراحی گردیدند (جدول 1).

جدول1: آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

اندازه محصول	توالی	نام	منبع
3025bp	TTTGCTACTCCTCTTTCGG	MD- F	مطالعه حاضر
	ATTACGGTTGCCTATCTGG	MD- R	
850bp	CGCATACTGTTATCTGG	CamF	مطالعه حاضر
	CGCATACTGTTATCTGG	CamR	
1676 bp	AAACGGGCTGATACCCTTCT	PAIF	رفرانس (24)
	TCAACATGCTTCCAGCACTC	PAIR	

به منظور شناسایی حضور ژن icsA در سویه های شیگلای جداشده، یک جفت آغازگر اختصاصی با نام MDF, MDR بدون جایگاه برش آنزیمی، در نواحی بالا دست و پایین دست ژن با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژنی طراحی و سنتز گردید(سیناکلون، ایران). این آغازگرها به گونه ای طراحی گردید تا از هر دو انتهای' 3 و' 5 ژن icsA ؛ 142bpداخل ژن را شناسایی می کردند به این نحو 284bp از ژن مذکور از هر دو انتها نادیده گرفته شده و نقصی در توالی ژن ایجاد می گردد. جهت استخراج DNA ژنومیک بعداز تلقیح باکتری در محیط LB مایع نمونه ها به مدت 18 ساعت در گرم خانه شیکردار با سرعت 200دور در دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد گرمادهی شد. ژنوم باکتری با استفاده از کیت تخلیص ژنومی AccuPrep (کره جنوبی ,Bionner) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید.

DNA به دست آمده از مرحله قبل، به کمک واکنش PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن icsA تکثیر شد. واکنش PCR به منظور تکثیر DNA در حجم 50 میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش که شامل 0/4میکرومول از هر آغازگر، 0/2میلی مولار از مخلوط نوکلئوتید های dATP، dCTP، dGTP، dTTP و 2/5واحد از آنزیم DNA پلی مراز Pfu ،1میلی مولار از بافر 10X، 2/5 میلی مولار $MgCl_2$ و 50 نانوگرم از DNA تهیه گردید. چرخه های PCR شامل مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای 94 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه و دوره سه مرحله ای شامل واسرشت شدن ابتدایی در دمای 94 درجه سانتی گراد به مدت 40 ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای 54 درجه سانتی گراد به مدت 40 ثانیه، طویل سازی قطعه مورد نظر در 72 درجه سانتی گراد به مدت 2:40 دقیقه و در پایان، مرحله تکثیر نهایی در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه بود. محصول PCR پس از رنگ آمیزی در اتیدیوم بروماید (با غلظت 10 میکروگرم در هر میلی لیتر) بر روی ژل آگارز 1٪ به کمک مارکر مولکولی مورد تأیید قرار گرفت. به منظور آماده سازی محصول PCR، DNA تکثیر شده با استفاده از کیت High Pure PCR Product (آلمان ,Roche) خالص سازی و جهت هم سانه سازی برای الحاق آماده گردید.

هضم آنزیمی حاملpGEM-7zf با استفاده از آنزیم SmaI در واکنش هضم یک گانه شامل 1 میلی مولار از بافر 10xو 0/2 میکروگرم حامل pGEM-7zf و 10 واحد آنزیم محدود گر SmaI در حجم کلی 25 میکرولیتر تهیه و سپس به مدت 4 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد قرار داده شد، تا پس از انجام برش، پلاسمید خطی برش خورده با انتهای صاف ایجاد شود.

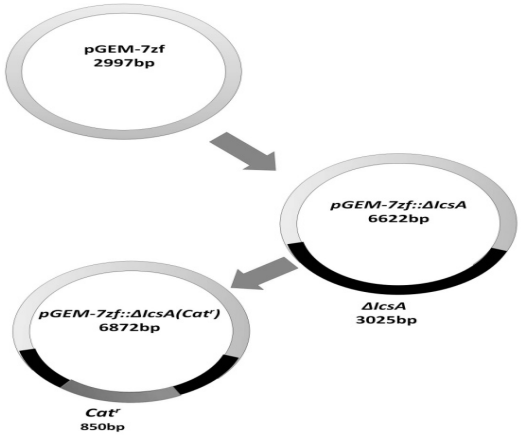
مخلوط محصول PCR و پلاسمید برش خورده با نسبت 1 به 3 تهیه و به مدت 10 دقیقه در 37 درجه سانتی گراد گرمادهی شد و بلافاصله به ظرف یخ منتقل گردید، سپس 5 واحد از آنزیم T_4 DNA Ligase و 5 میکرولیتر از بافر10xبه آن اضافه و به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه سانتی گراد قرار گرفت.

پلاسمیدهای نوترکیب با روش شوک الکتریکی به یاخته مستعد E. coli سویه DH5α تاریخت گردید. برای این کار ابتدا سلولهای مستعد پذیرنده الکتریکی تهیه (۲۳،۲۲) و سپس 40 میکرولیتر از سلولهای مستعد شده با 5 میکرولیتر از مخلوط واکنش اتصال آمیخته گردید و به مدت 1 دقیقه بر روی یخ قرار داده شد، سپس بعداز انجام الکتروپوریشن (شوک الکتریکی 0/2کیلو ولت در میلی ثانیه) بلافاصله به کووت، محیط SOC اضافه گردید و به مدت 2ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد کشت داده شد. باکتری های رشد کرده با دور 4000دور در دقیقه سانتریفیوژ و در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (100 میکروگرم بر میلی لیتر)، IPTG (0/1 مولار) و X-GAL (میلی گرم بر میلی لیتر 20) به صورت چمنی کشت شدند، پلیت های حاصل به مدت 18 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند تا کلونی های آبی یا سفید ظاهر شود. تک کلون های سفید که نشان دهنده حضور قطعه کلون شده در جایگاه منطقه چندگانه برش آنزیمی (MCS) در ژن LacZ واقع در پلاسمید pGEM-7zf بود از روی پلیت جداسازی گردید. صحت هم سانه سازی پرگنه های حاوی قطعه مورد نظر، به کمک PCR و در نهایت توالی یابی تأیید گردید(تصویر1). برای انجام این کار، پلاسمید باکتری با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (کره جنوبی ,Bionner) استخراج و مطابق روش قبل، واکنش PCR اجرا گردید. پلاسمیدهای مثبت پس از خالص سازی توسط آغازگرهای عمومی M13 حامل و آغازگرهای طراحی شده به منظور تکثیر ژن icsA به منظور تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست فرستاده شد.

میزبان حامل پلاسمید نوترکیب pGEM-7zf::ΔicsA در محیط LB مایع حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین در دمای 37 درجه سانتی گراد و شیکر 150 دور دقیقه به مدت 24 ساعت کشت داده شد، سپس با کمک کیت تجاری plasmid extraction (کره جنوبی,Bionner) تخلیص و آماده برش گردید، بر اساس بررسی نقشه برش آنزیمی ژن icsA جایگاه برش آنزیم EcoRV در نقطه 1530bp از توالی ژن اصلی شناسایی گردید و با استفاده از آنزیم EcoRV (فنلاند ,Fermentas) در واکنش هضم یک گانه شامل؛ 1میلی مولار از بافر 10x، 0/25 میکروگرم پلاسمید نوترکیب pGEM-7zf::ΔicsA و 10 واحد از آنزیم محدود کنندهEcoRV در حجم کلی 25 میکرولیتر تهیه و سپس به مدت 8 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد قرار داده شد. محصول واکنش هضم بر روی ژل آگارز 1 درصد، الکتروفورز گردید. حامل نوترکیب خطی شده pGEM-7zf::ΔicsA از روی ژل با استفاده از کیت Gel Purification (آمریکا,QIAGEN) خالص سازی و آماده انجام واکنش اتصال با ژن مقاومت به کلرامفینیکل گردید.

از ژن مقاومت به کلرامفینیکل پلاسمید (آمریکا ,Invitrogen) plenti4 Block it dest بعنوان الگو استفاده گردید. با استفاده از نقشه پلاسمید و با کمک نرم افزار Allel ID6 دو آغازگر CamF, CamRکه قادر به فراوان سازی ژن عمل کردی مقاومت به کلرامفینیکل به هم راه آغازگر (پروموتر) آن بودند طراحی گردید. واکنش PCR به منظور فراوان سازی ژن مقاومت آنتی بیوتیکی در حجم 50 میکرولیتر انجام گرفت که هر واکنش شامل 0/5 میکرومول از هر آغازگر، 0/2میلی مولار از مخلوط نوکلئوتید های dTTP, dGTP, dCTP, dCTP, dATPو 2/5 واحد از آنزیم DNA پلیمراز pfu، 5 ماکرولیتر ازبافر 10X، 2/5 میلی مولار $MgCl_2$ و 50 نانوگرم از الگوی پلاسمیدی DNA بود. چرخه های PCR شامل مرحله شوک واسرشت شدن در دمای 94 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه و دوره سه مرحله ای شامل واسرشت شدن ابتدای در دمای 94 درجه سانتی گراد به مدت 40 ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای 53 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، طویل سازی قطعه مورد نظر در 72 درجه سانتی گراد به مدت 55 ثانیه و در پایان، مرحله تکثیر نهای در دمای 72 درجه سانتی گراد به مدت 6 دقیقه بود. محصول PCR بر روی ژل آگارز 1 درصد الکتروفورز گردید. ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کلرامفینیکل از روی ژل با استفاده از کیت Gel Purification (آمریکا,QIAGEN) خالص سازی و آماده انجام واکنش اتصال با حامل نوترکیب خطی شده pGEM-7zf::ΔicsA گردید.

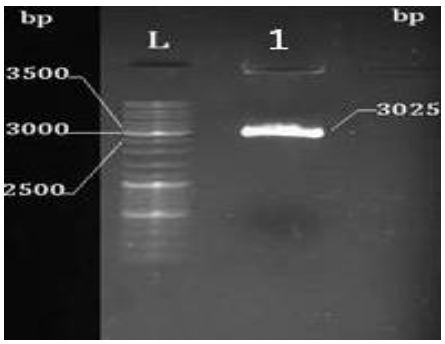
به منظور واکنش اتصال میان ژن مقاومت به آنتی بیوتیک و پلاسمید نوترکیب خطی شده pGEM-7zf::ΔicsA (تصویر1) مخلوط محصول PCR و پلاسمید برش خورده با نسبت 1 به 3 تهیه و به مدت 10 دقیقه در 37 درجه سانتی گراد گرمادهی گردید و بلافاصله به ظرف یخ منتقل شد و سپس 5واحد از آنزیم T_4 DNA Ligase و 2 میکرولیتر از بافر 10x در حجم کلی 20 ماکرولیتر تهیه و به مدت 16 ساعت در دمای 4 درجه سانتی گراد قرار گرفت. به منظورتاریخت نمودن میزبان باکتریایی(مستعد شده) سویه DH5α از روش شوک الکتریکی استفاده گردید، سپس باکتری های تاریخت شده جهت غربالگری در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (100 میکروگرم بر میلی لیتر) و کلرامفینیکل (34میکروگرم بر میلی لیتر) به صورت چمنی کشت داده شدند و سپس به مدت 18 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد گرما گذاری انجام گرفت.

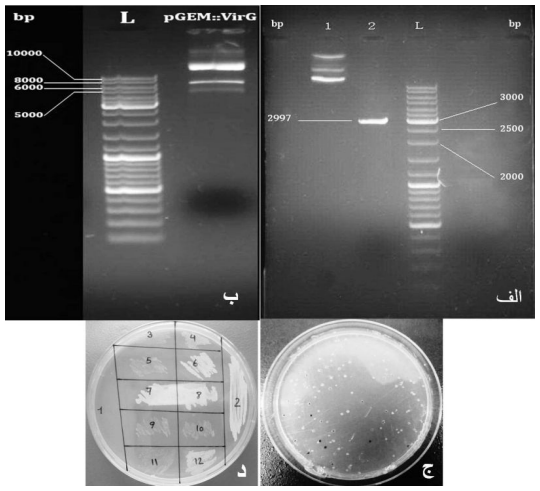


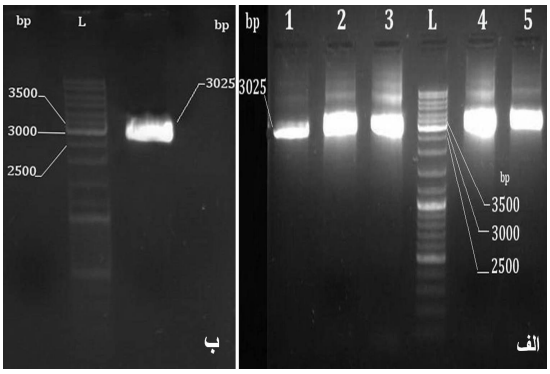
از پرگنه های باکتری های رشد کرده در محیط حاوی هر دو آنتی بیوتیک آمپی سیلین و کلرامفینیکل ماتریکس باکتریایی تهیه گردید و با استفاده از روش کلونی PCR و با آغازگرهای MDF,MDR صحت انجام هم سانه سازی ژن مقاومت به کلرامفینیکل درون ژن icsA تائید شد و از حامل سازه (pGEM-7zf::ΔicsA(Cat^r گلیسرول استوک تهیه و در دمای70- نگهداری شد.

یافته ها

نتایج واکنش های بیوشیمیایی و آنتی سرمی، گونه و سروار شیگلا فلکسنری2a را، در نمونه های دریافتی از بیمارستان طالقانی، تایید نمود. حضور ژن icsA از طریق واکنش PCR، تکثیر و بر روی ژل آگاروز 1% مطالعه شد. قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف هم خوانی داشت(تصویر.2، ستون 1). بعلاوه به منظور تأیید بیشتر همسانه pGEM-7zf::ΔIcsA با آغازگرهای عمومی M13 حامل، توالی یابی گردید، نتایج مشابهت 100 % ژن IcsA سویه بومی با توالی استاندارد (شماره دسترسی AF386526.1) در بانک ژنی را نشان داد. جهت خطی نمودن حامل pGEM-7zf به منظور هم سانه سازی ژنIcsA ، از واکنش هضم آنزیمی توسط SmaI استفاده شد، در اثر برش آنزیمی حامل pGEM-7zf قطعه 2297 bpجفت بازی با انتهای صاف (Blunt) به دست آمد(تصویر. 3الف، ستون2). بعداز انجام هم سانه سازی و تراریختی میزبان باکتریایی، مشاهده پرگنه های سفید موید ورود پلاسمید نوترکیب درون میزبان خود بود(تصویر. 3ج)، با تهیه ماتریکس از پرگنه های سفید در محیط حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین(تصویر. 3د) و انجام کلونی PCR با آغازگرهای اختصاصی ژنicsA از حضور ژن مذکور درون حامل اطمینان حاصل گردید (تصویر. 4الف).

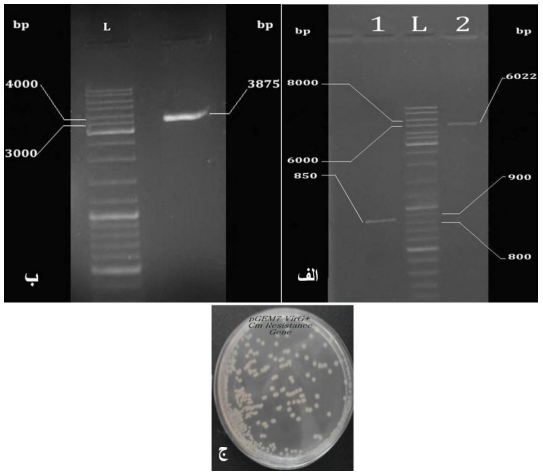






هم زمان با تهیه گلیسرول استوک از پرگنه مورد تائید قرار گرفته با آزمون کلونی PCR به جهت اطمینان دوباره و رد احتمال کاذب مثبت که گاهی در روش کلونی PCR ایجاد می گردد با انجام تخلیص پلاسمید(تصویر. 3ب) بر روی پلاسمید نوترکیبpGEM-7zf::ΔicsA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن icsA ، PCR انجام گرفت(تصویر. 4ب) و مجددا با این روش نیز هم سانه سازی تائید گردید. در مرحله دوم با آنالیز رایانه ای و به کمک نرم افزار Gene Runner مشخص گردیدکه ژن icsA دریک جایگاه و در موقعیت 1530bpاز کل ژن دارای سایت برشی برای آنزیم EcoRV می باشد. بعداز برش آنزیمی ژن هم سانه سازی شده درون پلاسمید نوترکیب pGEM-7zf::ΔicsA با آنزیم محدودگر EcoRVو خطی شدن و تخلیص(تصویر. 5ب) حامل آماده واکنش اتصال دوم گشت(تصویر 1).

ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کلرامفینیکل نیز بعداز فراوان سازی و تخلیص، الکتروفورز و غلظت سنجی شد(تصویر. 5الف) سپس با انجام واکنش اتصال و انجام تراریختی با روش الکتروشیمیایی، سازه ساخته شده درون میزبان باکتریایی وارد و بر روی محیط کشت حاوی هردو آنتی بیوتیک آمپی سیلین و کلرامفینیکل پرگنه های تراریخت شده رشد کردند(تصویر. 5ج) بعداز تخلیص پلاسمید، سازه (pGEM::ΔicsA(Cat^r تخلیص و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی icsA تحت PCR قرار گرفت که با توجه به تصویر 1 طول محصول PCR 3875bp مورد انتظار حاصل گردید(تصویر. 5ب) و ساخت سازه (pGEM::ΔicsA(Cat^r مورد تائید قرار گرفت.



بحث

تا کنون تلاش های بسیار زیادی جهت تولید یک واکسن ایمن و موثر برعلیه 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 نکرده اند و گاهی مصرف آنها به یک کشور خاص و در گروه سنی خاصی محدود شده است. یکی از مهم ترین راه کارهای تولید واکسن علیه شیگلوز تولید واکسن های زنده مهاجم و 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 دارند(۲۵،۲۶).

میترت و هم کاران در سال 1984 سویه جهش یافته T32-ISTRATI را با استفاده از تکنیک پاساژ متوالی در شیگلا فلکسنری 2a ایجاد نمودند. این کاندیدای واکسنی پس از 32 مرتبه کشت متوالی در محیط نوترینت آگار جداسازی و از نظر ایجاد ورم ملتحمه در چشم خوکچه هندی (تست Sereny) منفی گزارش گردید(27). ونکاتسن و هم کاران در سال 1990 سویه کاندیدای واکسنی T32-ISTRATI را از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی ارزیابی نمودند. ارزیابی ها حذف سه لکوس icsA، invA وIpaABCD را در پلاسمید تهاجمی شیگلا نشان داد. هم چنین کاندیدای واکسنی شیگلا فلکسنری 2a وابسته به استرپتومایسین (SmD) نیز با روشی مشابه که در ساخت T32-ISTRATI به کار رفت، در سال 1972 ایجاد شد. تکنیک پاساژ متوالی معایبی چون عدم اختصاصیت، برگشت پذیری به نوع وحشی و ناپایداری ژنتیکی را دارد، بنابراین به منظور ایجاد جهش اختصاصی و هدف مند در باکتری مناسب نیست(28).امروزه با پیشرفت روش های مهندسی ژنتیک تکنیک های مختلفی به منظور ایجاد جهش و گسستگی در ژن ها استفاده می گردد که بیش ترین آنها بر پایه غیر فعال کردن ژن ها از طریق دخول کاست ژنی و یا حذف ژن بنا شده اند. یکی از مهم ترین روش ها، استفاده از پلاسمید های انتحاری می باشد. یوشیکاوا و هم کاران در سال 1995 با ایجاد دو جهش در ژن های icsA و thyA توانستند سویه تخفیف حدت یافته شیگلا فلکسنری 2a را با استفاده از ترانسپوزون Tn10 و فاژ P1 ایجاد کنند. ایجاد نشدن التهاب و حفاظت در برابر شیگلا از نتایج آن در مدل حیوانی خوکچه هندی بود(29). سویه کاندیدای واکسنی CVD1203 (ΔicsA, ΔaroA) توسط نورجیا و هم کاران در سال 1994 با استفاده از پلاسمید های خودکشان pFJ201، pKTN701 ساخته شد(30). 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 CFU تا 10^9) بخشی از دریافت کنندگان به سویه واکسنی واکنش منفی نشان دادند(19). 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، CVD1204 (ΔguaBA)، CVD1205 (ΔicsA, ΔguaBA)، 1207 CVD (Δsen, ΔguaBA،Δset) و CVD1208 (ΔguaBA, ΔicsA Δset, Δsen,)، بر پایه استفاده از پلاسمید های خود کشان و پدیده تبادل آللی طراحی و ساخته شدند. نتایج بالینی سویه های تولید شده نشان دادند که حذف و غیر فعال نمودن این ژن ها تحمل پذیری و ایمنی زایی بالایی را در انسان سبب می گردد(19). ونکاتسن و هم کاران در سال 2002 با ایجاد جهش در دو ژن icsA و stxA سویه کاندیدای واکسنی WRSd1 را ایجاد نمودند. در این تحقیق از پلاسمید خودکشان pCVD442 و محیط حاوی کلرات پتاسیم به منظور حذف ژن های icsA و stx استفاده گردید(19). سدورژ و هم کاران در سال 2008 سویه کاندیدای واکسنی SC599، را از سویه شیگلا فلکسنری 2a حامل جهش حذفی در ژن های icsA، entF (ژن مسئول بیوسنتز انتروکلین)، fepA (گیرنده دریافت کننده انتروکلین) و fes (مسئول رها سازی از Fe^{3+} از انتروکلین) و stx ساختند. در این تحقیق از پلاسمید انتحاری 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(31). مهندسی ژنتیک معکوس روش قدرت مندی برای شناسایی کارکرد ژن ها و ایجاد جهش در آنها می باشد به شرطی که با ایجاد جهش و یا غیر فعال سازی ژن مورد نظر، تاثیرات آن بر روی میکروارگانیسم قابل ارزیابی و سنجش باشد. در حذف ژنی از روش تبادل توالی های هم سان اولین و مهم ترین گام ساخت سازه یا کاست ژنی مناسب و کار آمد است، از سوی اگرچه در گزارشات داده شده توسط محققان دیگر در مواردی حذف های با طول های کوتاه کاست ژنی انجام گرفته با این وجود و بر اساس قانون انجام کراسینگ آور به ازا یک واحد طول نقشه کروموزومی یک درصد احتمال انجام کریسینگ آور افزایش می یابد لذا هرچه طول توالی مشابه در کاست بیشتر باشد احتمال انجام حذف افزایش خواهد یافت و درتحقیق حاضر با ساخت کاست ژنی که هر کدام از توالی های کناری آن در حدود 1500 نوکلئوتید طول دارند، اگرچه در زمان دست ورزی حین انجام کار آزمایشگاهی احتمال شکست ژنی در کاست وجود دارد و مراقبت، احتیاط و مهارت بالای را می طلب اما سازه ای کارامد تر را جهت حذف ژنی عرضه نموده است. از طرفی هم سانه سازی کاست ژنی درون یک حامل مطمئن موجب ماندگاری و رفع مشکل به غلظت رساندن کاست ژنی در هنگام انجام کار است که یکی دیگر از مشکلات در حذف ژنی بر اساس توالی های هم سان می باشد.

نتیجه گیری

امروزه کارایی استفاده از حذف ژنی از طریق توالی های هم سان و با تکیه بر روش λ Red recombineering در بسیاری از باکتری های حدت زا مانند شیگلا اثبات شده است. درمجموع، سازه(pGEM-7zf::ΔicsA(Cat^r) با داشتن حدوداً 1500جفت باز توالی مشابه با نواحی از ژن هدف (icsA) در هر طرف خود و قرار گیری یک ژن مقاومت به کلرامفینیکل به عنوان یکی از کوچک ترین نشانه آنتی بیوتیکی در میانه آن، یک سازه مناسب برای ایجاد جهش در پلاسمید تهاجمی گونه های شیگلا می باشد.

سپاس گزاری

از دکتر آل بویه و خانم نوچی از بیمارستان آیت الله طالقانی، مرکز تحقیقات بیماری های اسهال ناشی از مواد غذایی؛ به خاطر هم کاری صمیمانه و در اختیار قرار دادن سوش های باکتری مورد نیاز کمال تشکر و قدر دانی را داریم.

REFERENCES

1. Banish LD, Sims R, Sack D, Montali RJ, Phillips L, Jr., et al. (1993) Prevalence of shigellosis and other enteric pathogens in a zoologic collection of primates. J Am Vet Med Assoc. 1993 Jul; 203(1): 126-132.

2. Kelly-Hope LA, Alonso WJ, Thiem VD, Anh DD, Canh do G, et al. Geographical distribution and risk factors associated with enteric diseases in Vietnam. Am J Trop Med Hyg. 2007 Apr; 76(4): 706-712.

3. Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive Escherichia coli and Shigella spp. Infect Immun. 2004 Sep; 72(9): 5080-5088.

4. Venkatesan MM, Ranallo RT. Live-attenuated Shigella vaccines. Expert Rev Vaccines.2006 Oct; 5(5): 669-686.

5. Jin Q, Yuan Z, Xu J, Wang Y, Shen Y, Lu W, et al. Genome sequence of Shigella flexneri 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of Escherichia coli K12 and O157. Nucleic Acids Res. 2002 Oct 15; 30(20):4432-41.

6. Bangtrakulnonth A, Vieira AR, Lo Fo Wong DM, Pornreongwong S, Pulsrikarn C, Sawanpanyalert P, et al. Shigella from humans in Thailand during 1993 to 2006: spatial-time trends in species and serotype distribution. Foodborne Pathog Dis. 2008 Dec; 5(6):773-84.

7. Na-Ubol M, Samosornsuk S, Von Seidlein L, Tapchaisri P, Ali M, Clemens JD, et al. Molecular characteristics of Shigella spp. isolated from patients with diarrhoea in a new industrialized area of Thailand. Epidemiol Infect. 2006 Oct; 134(5):997-1003.

8. Zaman K, Yunus M, Baqui AH, Hossain KM. Surveillance of shigellosis in rural Bangladesh: a 10 years review. J Pak Med Assoc. 1991 Apr; 41(4):75-8.

9. Ranallo RT, Thakkar S, Chen Q, Venkatesan MM. Immunogenicity and characterization of WRSF2G11: a second generation live attenuated Shigella flexneri 2a vaccine strain. Vaccine. 2007 Mar; 25(12): 2269-2278.

10. Girard MP, Steele D, Chaignat CL, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human enteric infections. Vaccine. 2006 Apr; 24(15): 2732-2750.

11. Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from Shigella flexneri. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Des; 85(23): 9317-9321.
12. Phalipon A, Sansonetti PJ. Shigellosis: innate mechanisms of inflammatory destruction of the intestinal epithelium, adaptive immune response, and vaccine development. Crit Rev Immunol. 2003; 23(5-6): 371-401.

13. Sansonetti PJ. The bacterial weaponry: lessons from Shigella. Ann N Y Acad Sci . 2006 Aug ;1072: 307-312.

14. Bernardini ML, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ. Identification of icsA, a plasmid locus of Shigella flexneri that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 may; 86(10): 3867-3871.

15. Lett MC, Sasakawa C, Okada N, Sakai T, Makino S, et al. virG, a plasmid-coded virulence gene of Shigella flexneri: identification of the virG protein and determination of the complete coding sequence. J Bacteriol. 1989 Jan; 171(1): 353-359.

16. Suzuki T, Sasakawa C. Molecular basis of the intracellular spreading of Shigella. Infect Immun. 2001Oct ; 69(10): 5959-5966.

17. Coster TS, Hoge CW, VanDeVerg LL, Hartman AB, Oaks EV, et al. Vaccination against shigellosis with attenuated Shigella flexneri 2a strain SC602. Infect Immun .1999 Jul; 67(7): 3437-3443.

18. May KL, Morona R. Mutagenesis of the Shigella flexneri autotransporter IcsA reveals novel functional regions involved in IcsA biogenesis and recruitment of host neural Wiscott-Aldrich syndrome protein. J Bacteriol. 2008 jul; 190(13): 4666-4676.

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

20. Kotloff KL, Noriega FR, Samandari T, Sztein MB, Losonsky GA, et al. Shigella flexneri 2a strain CVD 1207, with specific deletions in virG, sen, set, and guaBA, is highly attenuated in humans. Infect Immun. 2000 Mar ; 68(3): 1034-1039.

21. Venkatesan MM, Goldberg MB, Rose DJ, Grotbeck EJ, Burland V, et al. Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of Shigella flexneri. Infect Immun. 2001 May ; 69(5): 3271-3285.

22. Barnoy S, Baqar S, Kaminski RW, Collins T, Nemelka K, et al. Shigella sonnei vaccine candidates WRSs2 and WRSs3 are as immunogenic as WRSS1, a clinically tested vaccine candidate, in a primate model of infection. Vaccine. 2011 Aug; 29 (3): 6371-6378.

23. Rahman KM, Arifeen SE, Zaman K, Rahman M, Raqib R, et al. Safety, dose, immunogenicity, and transmissibility of an oral live attenuated Shigella flexneri 2a vaccine candidate (SC602) among healthy adults and school children in Matlab, Bangladesh. Vaccine. 2011 Feb; 29(6): 1347-1354.

24. Talukder K, Dutta D, Safa A, Ansaruzzaman M, Hassan H, Alam K et al. Altering trends in the dominance of Shigella flexneri serotypes and emergence of serolo-gically atypical S. flexneri strains in Dhaka, Bangladesh. J Clin Microbiol. 2001 Oct; 39(10):3757–3759.

25.Jennison A, Verma N. Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development. FEMS Microbiol Rev. 2004 Feb; 28(1):43–58.

26. 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. 2001Jul; 69(7): 4545–4553.
27.Meitert T, Pencu E, Ciudin L, 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 Jul; 43(4), 251–278.

28. 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. 1991May; 9(5): 358–363.

29.Yoshikawa M, Sasakawa Ch, Okada N, Takasaka M, Nakayama M, Yoshikawat Y and et al. Construction and evaluation of a icsA thyA double mutant of Shigella flexneri 2a as a candidate live attenuated oral vaccine. Vaccine. 1995; 13(15): 1436–1440.

30.Noriega F, Wang J, LosonskY G, Maneval D, Hone D, Levin M. Construction and Characterization of Attenuated AaroA AicsA Shigella flexneri 2a Strain CVD 1203, a Prototype Live Oral Vaccine. Infect Immun. 1994 Feb; 62(6):5168–5172.

31.Sadorge Ch, Ndiaye A, Beveridge N, Frazer S, Giemza R, Jolly N and et al. Phase 1 clinical trial of live attenuated Shigella dysenteriae type-1 ΔicsA Δent Δfep ΔstxA:HgR oral vaccine SC599 in healthy human adult volunteers. Vaccine. 2008 Feb; 26(7): 978–987.