ایجاد سازواره ژنی برای حذف ژن sipA از باکتری سالمونلا تیفی موریوم: مطالعه آزمایشگاهی

معصومه ساکی حسینی[۱]، عباس دوستی*[۲]، میلاد پزشکی[۳]

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۱۰/۰۱

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* یک باسیل گرم منفی، بدون اسپور، فاقد کپسول، متحرک و دارای فلاژل‌ها یکی از شایع‌ترین پری‌تریش است. سالمونلا عامل مسمومیت‌های غذایی می‌باشد. توانایی وارد شدن و زنده ماندن در سلول‌های میزبان شرط لازم برای بیماری‌زایی گونه‌های سالمونلا است. پروتئین تهاجمی سالمونلا یک فاکتور بیماری‌زایی مهم است که توسط باکتری به سلول‌های میزبان منتقل می‌شود. این مطالعه با هدف ساخت سازواره‌ی ژنی برای حذف ژن SipA از باکتری سالمونلا تیفی موریوم و کلون سازی آن در باکتری اشریشیا کلی انجام گرفت.

مواد و روش کار: این مطالعه آزمایشگاهی از مهر ۱۳۹۶ تا خرداد ۱۳۹۷ در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام گرفت. در این تحقیق توالی '5 و '3 ژن SipA به کمک پرایمرهای اختصاصی آن‌ها و روش PCR تکثیر گردید. سپس هرکدام از این توالی‌ها به روش T/Acloning در حامل pGEM-Teasy کلون و سپس به باکتری اشریشیا کلی ترانسفورم گردید. با استفاده از روش PCR قطعات مربوط به هر ناحیه تکثیر و تأیید گردید. تأیید نهایی سازواره‌ی حاصل با استفاده از آنزیم‌های XbaI و XhoI انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان‌دهنده‌ی کلون سازی موفقیت‌آمیز ژن موردنظر در باکتری اشریشیا کلی و ساخت سازواره‌ی ژنی به طول ۱۵۲۰ جفت باز بود. همچنین حامل pET32 به طول ۵۹۰۰ جفت باز ازلحاظ ظرفیت پذیرش بهترین نوع حامل در پذیرش توالی سازواره بود.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل در این مطالعه به نظر می‌رسد که می‌توان با قرار دادن یک ژن، ژن آسیب‌زا را حذف و از آن به‌عنوان واکسن تضعیف‌شده علیه سالمونلوزیس مورد استفاده قرار نمود. به‌طوری‌که می‌توان با روش الکتروپوریشن این سازواره را وارد باکتری سالمونلا تیفی موریوم کرد و سپس به‌واسطه تشابه توالی‌های فرادست و فرودست ژن sipA و Kan نوترکیبی همولوگ بین این دو ژن اتفاق می‌افتد و ژن بیماری‌زا حذف خواهد شد.

کلیدواژه‌ها: سالمونلا تیفی موریوم، سازواره‌ی ژنی، اشریشیا کلی، T/A کلونینگ، ژن SipA

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره هشتم، ص ۵۸۰-۵۷۲، آبان ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی.، تلفن: ۳۳۳۶۱۰۴۸ – ۰۳۸

Email: abbasdoosti@yahoo.com

مقدمه

طبقه‌بندی باکتری‌های سالمونلا بسیار پیچیده است. بر اساس آخرین طبقه‌بندی، اعضای جنس سالمونلا به دو گونه سالمونلا انتریکا و سالمونلا بونگوری تقسیم‌بندی می‌شوند. سالمونلا انتریکا، بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و همولوژی DNA خود شامل ۷ زیرگونه است که هر یک شامل سروتایپ‌های مختلفی هستند. این جنس بر اساس آنتی‌ژن‌های فلاژل و سوماتیک به بیش از ۲۶۰۰ سروار تقسیم می‌شود که بیشتر آن‌ها برای انسان و حیوان بیماری‌زا هستند و اغلب انتقال بیماری از طریق آب و غذا صورت می‌گیرد (۱).

در میان باکتری‌های منتقل‌شده از طریق غذا، سالمونلا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که طیف وسیعی از بیماری‌ها از ورم معده‌ی خفیف خود محدود شونده تا تب حصبه سیستمیک کشنده را باعث می‌شود (۲). گاستروانتریت، شایع‌ترین و متداول‌ترین عفونت سالمونلایی در انسان است که توسط سروتایپ‌های سالمونلا به‌ویژه سالمونلا تیفی موریوم و انتریتیدیس ایجاد می‌شود. به‌طوریکه هر ساله حدود ۱/۴ میلیون نمونه از سالمونلوزیس غیرتیفوئیدی در ایالات‌متحده گزارش می‌شود (۳). گاستروانتریت حاد، تب روده‌ای تیفوئید یا پاراتیفوئید و عفونت‌های سیستمیک، ازجمله موارد

[۱] کارشناس ارشد گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

[۲] استادیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] کارشناسی ارشد، ژنتیک، دانشگاه اراک، اراک، ایران

ایجادشده توسط سروتایپ‌های سالمونلا تیفی موریوم و انتریتیدیس هستند. آلودگی‌های انسانی معمولاً از طریق مصرف غذاهای خام مانند گوشت، تخم‌مرغ و غذاهای روزانه حاصل می‌شود. بنابراین منبع اصلی تمامی این بیماری‌ها در انسان، ناشی از آلودگی مواد غذایی و حیوانی است (۴). این دو سروتایپ، مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای روده‌ای در حیوانات و انسان‌ها محسوب می‌شوند که از طریق آب و غذای آلوده انتقال می‌یابند و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی در سراسر دنیا مطرح هستند (۵). سالمونلا تیفی موریوم ازجمله گونه‌هایی است که علاوه بر انسان، میزبان‌های زیادی داشته و امکان شیوع آن بالا است (۶). از ویژگی‌های مهم این‌گونه، توانایی آن در باقی ماندن به شکل زنده و قابل تکثیر به مدت طولانی در محیط و نمونه‌های غذایی است. این باکتری یکی از عوامل مهم بیولوژیک است که در خرابکاری‌های عمدی در آلوده سازی آب و غذا در تاریخ، از آن استفاده شده است (۷). اگرچه اعضای جنس سالمونلا ازلحاظ قرابت ژنتیکی بسیار مشابه یکدیگر هستند، اما تغییرات گسترده‌ای در بروز بیماری و شدت بیماری‌زایی وجود دارد. کسب یا از دست دادن برخی از ژن‌ها، نقش مهمی در تکامل سروتایپ‌های مختلف سالمونلا ایفا می‌کند. روش‌های مبتنی بر تجزیه‌وتحلیل DNA، بسیاری از محدودیت‌های روش‌های فنوتیپی را برطرف می‌نماید و دانش ما را در مورد روابط اپیدمیولوژیکی و ژنتیکی دخیل در عفونت‌های انسانی بهبود می‌بخشد (۸). سالمونلوز یکی از بیماری‌های عفونی مهم و مشترک بین انسان و دام است. سرووارهای سالمونلا باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی و توکسین زا بوده که به خانواده آنتروباکتریاسه تعلق دارند (۹). بیماری عموماً با سقط، آنتروکولیت توأم با اسهال و اسهال خونی، سپتیسمی و مرگ همراه است. ابتلا به سالمونلا می‌تواند سبب گسترش شکل مخفی بیماری بدون عوارض بالینی شود (۱۰). در سال ۱۸۸۸ گارتنر از فردی که در اثر گاستروانتریت ناشی از مصرف گوشت نپخته، مرده بود جرمی جدا کرد و آن را سالمونلا نامید که بعدها سالمونلا اینتریتیدیس خوانده شد. در سال ۱۸۹۶ یک جراح انگلیسی به نام آلمورت رایت اولین حفاظت را علیه سالمونلا انجام داد و واکسن آنتی تیفوئید توسعه یافت (۱). ازجمله کارهایی که تاکنون انجام شده، تهیه‌ی واکسن حاوی دو جهش حذفی cya/crp(حذف ژن کد کننده‌ی سیکل آدنیلات و ژن پروتئین گیرنده‌ی آدنوزین مونو فسفات سیکل یا cAMP) در سال ۲۰۱۰ است. در همان سال واکسیناسیون جوجه‌ها با سویه‌ی سالمونلا گالیناریوم حاوی جهش حذفی cobs/cbin(ژن درگیر در مسیر بیوسنتز سیانوکوبالامین ویتامین B12) نیز انجام شد که تزریق آن، کاهش سالمونلا تیفی موریوم در روده کور و طحال را نشان داد و گروه‌هایی از جوجه‌ها که دو بار واکسینه شدند کمتر به سالمونلا اینتریدیتیس مبتلا شدند. در سال ۲۰۱۱ یک سالمونلا اینتریدیتیس حاوی جهش phop/flic (پروتئین flic یکی از اجزای مهم تاژک سالمونلا است که رشته‌ای و برای چسبندگی مهم است و phop جزئی از سیستم نظارتی دوبخشی phop/poQ که نقش مهمی در بیماری‌زایی دارد) به‌عنوان واکسن در جوجه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۱). در سال ۲۰۱۳ حذف دو ژن pfIB و adhF درگیر در مسیر متابولیسم پیروات سالمونلا تیفی موریوم، بیان ژن SPI-1 را تغییر داد، که SPI-1 سیستم ترشحی نوع III سالمونلا را کد می‌کند و در تولید پروتئین‌های عمده‌ی بیماری‌زای سالمونلا نقش دارد (۱۲). سالمونلا با ورود به سلول‌های غیر فاگوسیتوز و آغاز همانندسازی در داخل آن‌ها و ساخته‌شدن رشته‌های اکتین و اتصال آن‌ها باعث اسهال و استفراغ شدید در انسان می‌شود که این تحریک به‌وسیله‌ی چهار پروتئین مهاجم سالمونلا رخ می‌دهد. ساخت و دسته‌بندی رشته‌های اکتین در سالمونلا به‌طور مستقل از اجزای سلول میزبان صورت می‌گیرد و این فعالیت پاتوژن ناشناخته است (۱۳). پروتئین sipA در سالمونلا تیفی موریوم انتقال پروتئین کیناز C به بخش غشایی را تنظیم می‌کند. سالمونلا تیفی موریوم از طریق sipA، مسیر انتقال سیگنال وابسته به پروتئین کیناز C را فعال می‌کند و باعث تحریک نوتروفیل‌های دارای هسته‌ی چندشکلی یا پلی مورفونوکلئار و تولید اینترلوکین ۸ در سرتاسر لومن روده می‌شود که پاسخ التهابی شدیدی به وجود می‌آورد. پروتئین sipA توسط سیستم ترشحی نوع III تولید می‌شود که این سیستم به‌وسیله‌ی جزایر بیماری‌زایی سالمونلا (SPI-1, SPI-2) کد می‌شود (۱۴). واکسیناسیون دهانی به جوجه‌ها با یک سالمونلا انتریدیتیس نژاد جهش‌یافته *aroA* (اختلال در ترکیب مؤلفه‌ی کلیدی در مسیر بیوسنتز (نتیجه‌ی آن کاهش میزان رقابت نژادهای سالمونلا در ارگان‌های داخلی (۲-۱ واحد) و در روده کور (۲< واحد) شد (۱۵). همچنین واکسن سالمونلا تیفی موریوم دارای دو جهش *cya/crp* (حذف ژن کد کننده‌ی سیکل آدنیلات و پروتئین گیرنده‌ی آدنوزین مونوفسفات سیکل) حاکی از کاهش میزان نژادهای رقابتی سالمونلا تیفی موریوم در روده کور تا سقف ۶ واحد شد (۱۶). واکسن‌های سالمونلا به چهار دسته تقسیم‌بندی می‌شوند. دسته اول واکسن زنده و تضعیف‌شده که شامل موتاسیون یا حذف ژن مسئول متابولیسم، واگیری یا بقاء ارگانیسم در میزبان است. این واکسن به‌واسطه‌ی فعال‌سازی آنتی‌بادی و پاسخ ایمنی بین سلولی، ایمنی محافظتی القاء می‌کند. واکسن‌های دسته دوم شامل واکسن غیرفعال کشته‌شده که از باکتری‌هایی که به‌وسیله‌ی روش‌های مختلف ازجمله گرما، فرمالین، استون و دیگر روش‌ها غیرفعال می‌شوند، به دست می‌آید. واکسن‌های دسته سوم شامل واکسن زیرواحدی می‌باشند که از یک یا چند آنتی‌ژن تعریف‌شده که عمدتاً پروتئین

هستند، تشکیل شده‌اند. به‌عنوان‌مثال عصاره‌ی پروتئین غشای خارجی سالمونلا. و نهایتاً دسته چهارم از واکسن‌های سالمونلا واکسن اسید نوکلئیک است که شامل پلاسمید باکتریایی که آنتی‌ژن‌های واکسن را کد می‌کند به‌گونه‌ای که بیان ژن توسط پروموتور یوکاریوتی قوی هدایت می‌شود (۱۷). هدف از این تحقیق تولید سازواره‌ی ژنی برای حذف ژن sipA در باکتری سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از روش همسان‌سازی می‌باشد.

مواد و روش کار

این مطالعه آزمایشگاهی در فاصله زمانی مهر ۱۳۹۶ تا خرداد ۱۳۹۷ در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام شد. در کلیه مراحل تحقیق جهت تکثیر و ترانسفرم نمودن وکتورها و سازه‌های ژنی نوترکیب ایجادشده، از باکتری اشریشیا کلی سویه Top10 استفاده شد. اشریشیا کلی سویه Top10 از بخش بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد گرفته شد. سالمونلا تیفی موریوم سویه استاندارد از بخش میکروبیولوژی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. به‌منظور کشت و تکثیر باکتری سالمونلا از محیط کشت TSI(Triple Suger Iron) که این محیط حاوی گلوکز، سوکورز، لاکتوز، سولفات آهن، عصاره‌ی بافری و یک معرف PH مثل فنل رد، استفاده شد.

سالمونلا برای رشد به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت نیاز دارد. از کلنی‌های رشد یافته با استفاده از کیت استخراج DNA سیناژن (DNPTM Kit, CinnaGen, Iran) بر طبق روش کار کیت، DNA ژنومی باکتری تخلیص گردید. پرایمرهای موجود در جدول شماره ۱ برای تکثیر قطعات فرادست و فرودست ژن SipA که با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner طراحی شده بود، استفاده شد. به‌منظور سهولت کلون سازی و سپس Sub-Cloning از برش آنزیمی در سر ’5 هر پرایمر بهره گرفته شد.

جدول (۱): توالی پرایمرهای استفاده شده جهت تکثیر قطعات فرادست و فرودست ژن *SipA* و *Kan*.

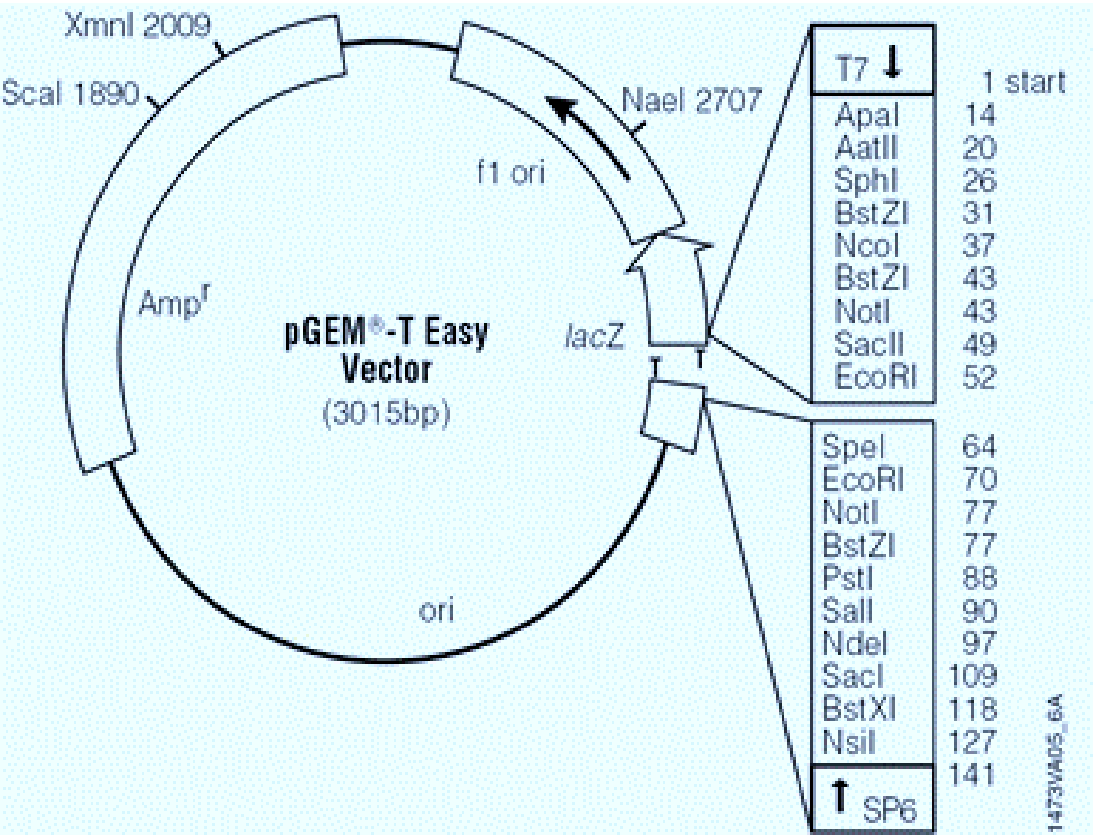
نام ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال	طول قطعه تکثیری	آنزیم‌ها
SipA- up-F	5'-TATTCTAGAGTTATGTGCTCACCGTTG-3'	62	310 bp	XbaI,Bglǁ
SipA-up-R	5'-CGTAGATCTTATCCTCTTCTGTTATCC-3'			
SipA-down-F	5'-ATAGAGCTCAAATGCGGGAAAGACG-3'	63	375 bp	SacI, XhoI
SipA-down-R	5'-CACCTCGAGCATAACAAGATTCGTC-3			
Kan3-F	5'-ATAAGATCTATGAGCCATATTCAGCGTG-3'	61	835 bp	Bglǁ, SacI
Kan2-R	5'-ATAGAGCTCTTAGAAAAATTCATCCAG-3'			

ژن کانامایسین که علاوه بر شاخص انتخاب برای غربالگری باکتری‌های ترانسفرم شده، به دلیل اینکه در درون ژن SipA درج می‌گردد، موجب ناک اوت شدن ژن SipA می‌شود. توالی کامل ژن کانامایسین از روی وکتورهای حامل این ژن نظیر pET28 به دست می‌آید. به این منظور برای ابتدا و انتهای ژن کانامایسین، پرایمرهای مناسب طراحی گردید و تکثیر این ژن با استفاده از برنامه دمایی و زمانی PCR موجود در جدول شماره ۲ به روش PCR انجام شد.

جدول (۲): برنامه دمایی و زمانی PCR جهت تکثیر ژن Kan.

Step	Temperature	Time	Cycle
Denaturation	95	5 min	1
Seg1:Denaturation	94	1min	32
Seg2:Anneealing	61		
Seg3:Extention	72		
Final Extention	72	7 min	1

به همین صورت PCR برای ژن‌های SipA-up و SipA-down به ترتیب در دماهای ۶۲ و ۶۳ درجه سانتی‌گراد (دمای اتصال پرایمر) انجام شد. سه محصول PCR که شامل ناحیه فرادست، ناحیه فرودست و ژن کانامایسین می‌باشد از ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل شرکت Bionner استخراج شد. برای کلون‌سازی از تکنیک T/A Cloning و کیت‌های تجاری واجد این سیستم نظیر وکتور pGEM T-easy ساخت شرکت Promega آلمان استفاده شد. نقشه ژنی این پلاسمید در شکل شماره ۱ قابل مشاهده می‌باشد.

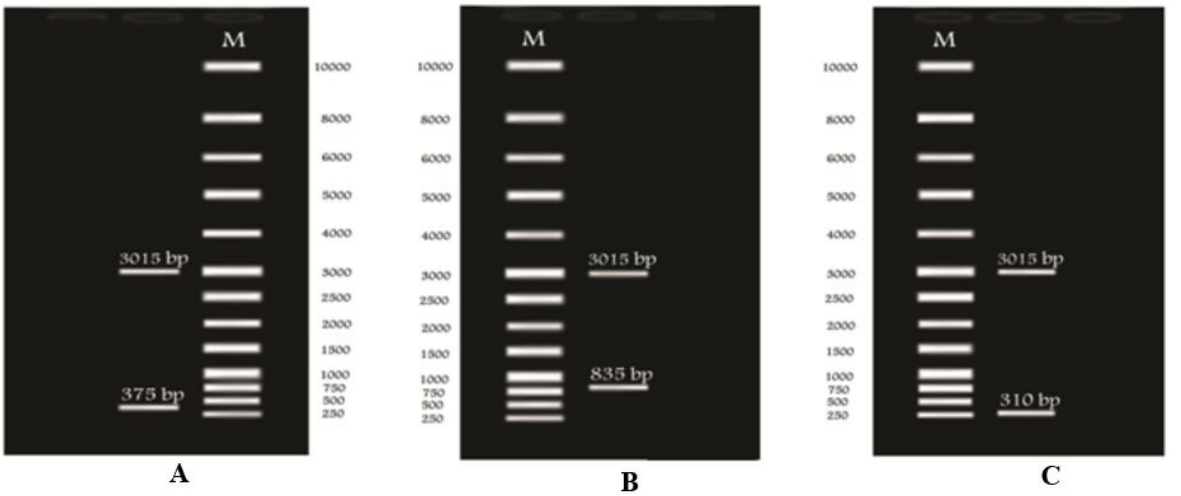


شکل (۱): نقشه ژنی پلاسمیدpGEM T-easy.

هر یک از قطعات DNA و ژن‌های کلون شده فوق الذکر که به صورت جداگانه در پلاسمید pGEM همسانه سازی گردیده‌اند در سلول باکتری اشریشیا کلی که از قبل آن را با محلول $CaCl_2$ مستعد کردیم ترانسفورم شد. سپس از ماتریکس‌های رشد کرده بهترین کلنی‌ها را انتخاب و با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Bionner پلاسمیدها استخراج گردیدند. در برش آنزیمی روی پلاسمیدهای استخراج شده، برای تأیید قطعی سازواره‌های ژنی pGEM- kan، pGEM-SipA- up و pGEM-SipA-down واکنش هضم اندونوکلئازی با آنزیم‌های مربوط انجام شد. سپس به روش برش آنزیمی جدا و به ترتیب فرادست-کانامایسین-فرودست، در پلاسمید pET32 به روش Sub-Cloning (وارد کردن ژن از وکتوری به وکتور دیگر) همسانه سازی شد و به روش‌های PCR و هضم آنزیمی و نهایتاً تعیین توالی مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت.

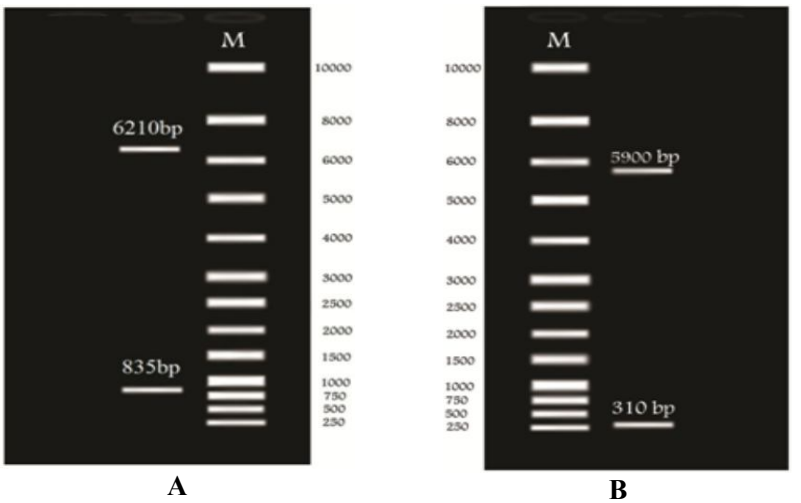
یافته‌ها

در برش آنزیمی روی پلاسمیدهای استخراج شده نتایج حاصل از فرایند کلون سازی و هضم اندونوکلئازی با مشاهده باندهای ۳۰۱۵ جفت بازی برای وکتور pGEM، ۸۳۵ جفت بازی برای kan، ۳۱۰ جفت بازی برای SipA- up و ۳۷۵ جفت بازی SipA- down روی ژل ۱/۵ درصد الکتروفورز توسط دستگاه UVIdoc به دست آمد (شکل شماره ۲).



شکل (۲): نتایج هضم آنزیمی وکتور pGEM روی ژل ۱/۵ درصد و مارکر ۱ کیلو باز شرکت فرمنتاز. A– pGEM با طول ۳۰۱۵ جفت باز و sipA- down با طول ۳۷۵ جفت باز. B– pGEM با طول ۳۰۱۵ جفت باز و ژن Kan با طول ۸۳۵ جفت باز. C–pGEM با طول ۳۰۱۵ جفت باز و ژن sipA- up با طول ۳۱۰ جفت باز.

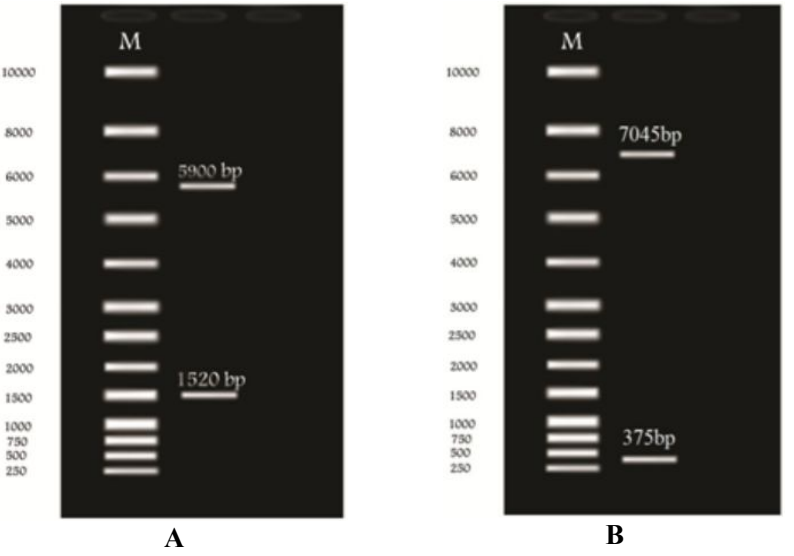
نتایج حاصل از هضم اندونوکلئازی پلاسمید pET32 که پس از استخراج پلاسمید و هضم اندونوکلئازی با آنزیم‌ها صحت ساب کلونینگ هر سه ژن kan، SipA- up و SipA - down در داخل وکتور روی ژل الکتروفورز تأیید شد.



شکل (۳): نتایج حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید pET32 روی ژل ۱/۵ درصد و مارکر یک کیلو باز شرکت فرمنتاز. A– وکتور pET32 بعلاوه توالی ژن sipA- up به طول ۶۲۱۰ جفت باز و توالی ژن کانامایسین به طول ۸۳۵ جفت باز. B- وکتور pET32 به طول ۵۹۰۰ جفت باز و توالی ژن sipA- up به طول ۳۱۰ جفت باز.

توالی‌های SipA-up و SipA-down ژن موردنظر برای حذف، به‌وسیله PCR و با طراحی پرایمرهای این نواحی تکثیر گردیدند و سپس با تکثیر ژن کانامایسین موجود در پلاسمید pGEM و کلون سازی ۳ محصول به دست آمده به صورت Kan-SipA-down- SipA- up به طول ۱۵۰۰ جفت باز در یک پلاسمید مناسب به نام pET32، سازواره با موفقیت ساخته و ساب کلون شد که بعد از هضم

نهایی با آنزیم‌های XbaI و XhoI نتایج مشاهده شد (شکل شماره ۴). همچنین حامل pET32 ازلحاظ ظرفیت پذیرش بهترین نوع حامل در پذیرش توالی سازواره بود. با توجه به نتایج حاصل در این مطالعه به نظر می‌رسد که می‌توان با قرار دادن یک ژن غیر بیماری‌زا، ژن آسیب‌زا را حذف و از آن به‌عنوان واکسن تضعیف شده علیه سالمونلوزیس مورد استفاده قرار نمود. به‌طوری‌که می‌توان با روش الکتروپوریشن این سازواره را وارد باکتری سالمونلا تیفی موریوم کرد و سپس به‌واسطه وجود تشابه در توالی‌های فرادست و فرودست ژن sipA و Kan نوترکیبی هومولوگ بین این دو ژن اتفاق می‌افتد و ژن بیماری‌زا حذف خواهد شد



شکل (۴): نتایج نهایی حاصل از هضم آنزیمی روی ژل ۱/۵ درصد و مارکر ۱ کیلو باز. A- هضم ابتدا و انتهای سازواره: وکتور pET32 به طول ۵۹۰۰ جفت باز و باند سازواره نهایی به طول ۱۵۲۰ جفت باز. B- وکتور pET32 بعلاوه دو توالی ژن Kan و sipA- up به طول ۷۰۴۵ جفت باز و باند توالی ژن sipA- down به طول ۳۷۵ جفت باز

بحث و نتیجه‌گیری

در سال ۲۰۰۰ برنشتین و همکاران برای حذف قطعه‌ای از ژن InvB قطعاتی شامل ۱۲ نوکلئوتید ابتدایی و ۱۸ نوکلئوتید انتهایی از ژن InvB انتخاب و توسط PCR تکثیر کردند سپس با کمک قطعات فرادست و فرودست همان ژن روی وکتور pKAS32 و از طریق روش نوترکیبی همسان قطعه‌ی موردنظر از ژن حذف گردید (۱۸). در نتیجه چنانچه توالی‌های فرودست و فرادست دو ژن مشابه باشند قابلیت نوترکیبی همسان با هم دارند و از این طریق ژن آسیب‌زا حذف خواهد شد. در سال ۲۰۰۷ والنتینا روزو و همکارانش در یک مطالعه با حذف ژن Crp در سالمونلا بیماریزایی آن را مورد بررسی قرار دادند. سالمونلای فاقد Crp در یک گروه از پرندگان آزمایش شد و نتیجه نشان داد که پرندگان تا حد زیادی نسبت به باکتری ایمنی پیدا کردند (۱۹). در سال ۲۰۰۸ آلنا سبکووا اثرات ژن جهش یافته‌ی Aro در سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا اینتریتیدیس را بررسی کرد که مشخص شد موتانت‌ها به سرم خون، آلبومین و EDTA حساس بودند و این نقص به علت کاهش مقاومت دیواره‌ی سلولی و غشای خارجی باکتری دارای جهش در ژن Aro به ایمنی ذاتی میزبان ایجاد می‌شود (۲۰). طبق مطالعات انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که حذف ژن بیماری‌زا یا به وجود آوردن جهشی خاص در ژن‌های سالمونلا می‌تواند مقاومت خود باکتری را کم کند و یا ایمنی میزبان درمقابل سالمونلای جهش یافته بالا می‌رود. در سال ۲۰۱۱ هانگیان و همکارانش ژن SipA را در گونه‌های تیفی موریوم و انتریتیدیس جهش دادند و نتیجه‌ی آن را در بیماریزایی مورد بررسی قرار دادند. مشخص شد که جهش در ژن SipA باعث کاهش بیماریزایی باکتری می‌شود (۲۱). در این میان واکسن‌های زنده‌ی سالمونلایی گوناگونی قابل دسترسی تولید کنندگان مرغ هستند و مجوز دسترسی تجاری دارند. سالمونلا اینتریکا زیرگونه‌ی گالیناریوم نژاد ۹۴ یک واکسن خوب شناخته شده است که در اروپا قابل دسترس است و برای مقابله با سالمونلا گالیناریوم و سالمونلا انتریدیتیس به کار می‌رود. در طی این مطالعات مرغ‌ها درهفته های ۶ و ۱۶ پس از تولد واکسینه می‌شوند. نتایج نشان داده که ۲/۵درصد از پرندگان به سالمونلا انتریدیتیس

پاسخ مثبت دادند (از بین گروه کنترل شده ۱۱/۵درصد) (۲۲). واکسن TAD سالمونلا E و TAD سالمونلا T واکسن‌های زنده هستند که حاوی جهش‌های رانش متابولیکی، شامل موتاسیون در ژن‌های کد کننده آنزیم متابولیک ضروری، می‌باشند. دو سویه واکسن فوق در یک مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند که به صورت خوراکی در روز اول از عمر جوجه‌ها و بعد ازآن در هفته‌های ۶ و ۱۶ از عمر آنها به کار گرفته شدند. از مقایسه کردن تخم‌مرغ با گروه شاهد پرندگان، نشان داده شد که هنگام واکسینه شدن پرندگان تعداد بسیار پایینی از ارگان‌های داخلی، سالمونلا مثبت‌اند. به هرحال در این مطالعه جوجه‌ها با تزریق وریدی به جای راه دهانی آزمایش شدند که ارزیابی این واکسن نسبت به دیگر واکسن‌ها دشوار بود (۲۳). به نظر می‌رسد که در مراحل بعدی می‌توان از این سازواره برای انجام نوترکیبی همولوگ بین ژن Kan و SipA استفاده شود که با حذف شدن ژن SipA تولید یک پروتئین بیماری‌زا درسالمونلا تیفی موریوم متوقف می‌شود و در آینده به‌عنوان یک واکسن تضعیف شده برای استفاده در صنعت طیور مورد بهره‌وری قرار گیرد که سلامتی غذایی انسان را در پی دارد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه با عنوان "ایجاد سازواره ژنی برای حذف ژن sipA از باکتری *سالمونلا تیفی موریوم*" در مقطع کارشناسی ارشد رشته ژنتیک در سال ۱۳۹۷ و با حمایت مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد و هزینه شخصی اجرا شده است.

References:

1. Ranjbar R, Sarshar M. Genetic diversity of clinical strains of Salmonella enteric serovar Typhimurium. J Mil Med 2012;14(2):143-7.
2. Xiaojuan Y, Jiahui H, Qingping Wu, Jumei Zh, Shengrong Liu, Weipeng G, et al. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of Samonella isolated from retail ready- to- eat foods in china. Food Control 2016;60:50-6.
3. Ranjbar R, Giammanco GM, Farshad S, Owlia P, Aleo A, Mammina C. Serotypes, antibiotic resistance and class 1integrons in Salmonella isolates from pediatric cases of enteritis in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis 2011;8(4):547-53.
4. Tennant SM, Levine MM. Live attenuated vaccines for invasive Salmonella infections. Journal: Vaccine. Vaccine 2015;33:C36-41.
5. Ranjbar R, Giammanco GM, Aleo A, Plano MR, Naghoni A, Owlia P, et al. Characterization of the first extendedspectrum b-lactamase producing nontyphoidal Salmonella strains isolated in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Dis 2010;7(1):91-5.
6. Naghoni A, Ranjbar R, Tabaraie B, Farshad S, Owlia P, Safiri Z, et al. High prevalence of integron-mediated resistance in clinical isolates of Salmonella enteric. Jpn J Infect Dis 2010;63(6):417-21.
7. Skjolaas KA, Burkey TE, Dritz SS, Minton JE. Effects of Salmonella enterica Serovars Typhimurium (ST) and Choleraesuis (SC) on chemokine and cytokine expression in swine ileum and jejunal epithelial cells. Vet Immunol Immunopathol 2006;111(3-4):199 209.
8. Ranjbar R, Soltan dalal MM, Talebi M, Pourshafie MR. Increased isolation and characterization of Shigella sonnei obtained from hospitalized children in Tehran, Iran. J Health Popul Nutr 2008;26(4):426-30.
9. Jianghui Zhu, Yao Bai, Yeru Wang, Xiaoyu Song, Shenghui Cui, Haibin Xu, et al. A risk assessment of salmonellosis linked to chicken meals prepared in households of china. Food control;79:279-87
10. Farré MR, Sánchez DO, Varela CA, Sanahuja MS, Recasens AR, Jové JP. Aspectos epidemiologicos and carga asistencial de gastroenteritis agudas por Campylobacter and salmonella. Medicina Clínica 2015;145(7):294-7.
11. Desin TS, Koster W, Potter AA. Salmonella vaccines in poultry: past, present and future. J Expert Rev Vaccines 2013; 12(1): 87-96.
12. Abernaty J, Corkill C, Hinojosa C, Li X, Zhou H. Deletions in the pyruvate pathway of. Salmonella

Typhimurium SPI1 mediated gene expression and infectivity. J Anim Sci Biotechnol 2013; 4(1):5. 1-12.

13. Abernathy J, Corkill C, Hinojosa C, Li X, Zhou H. Deletions in the pyruvate pathway of Salmonella Typhimurium alter SPI1-mediated gene expression and infectivity. J Anim Sci Biotechnol 2013;4(1):5.
14. .Silva M, Song C, Nadeau WJ, Matthews JB, McCormick BA. Salmonella Typhimurium sipA induced neutrophil transepithelial migration: involvement of a PKC-α-dependent signal transduction pathway. Am J Gastrointest Liver physiol 2004; 286(6): G1024-31.
15. Cooper GL, Venables LM, Woodward MJ, Hormaeche CE. Vaccination of chickenswith strain CVL30, a genetically definedSalmonella enteritidisaroA live oral vaccinecandidate. Infect Immun 1994; 62(11): 4747–54.
16. Cerquetti MC, Gherardi MM. Vaccinationof chickens with a temperature-sensitiv mutant of Salmonella enteritidis. Vaccine 2000;18(11–12): 1140–5.
17. Taseen S Desin, Wolfgang Köster, Andrew A Potter. Salmonella vaccines in poultry: past, present and future. Expert Rev Vaccines 2013: 12(1): 87–96.
18. Riyaz-Ul-Hassan S, Verma V, Qazi GN. Rapid detection of salmonella by polymerase chain reaction.J Mol Cell Probes 2004; 18(5): 333-9.
19. Rosu V, Chadfield MS, Santona A, Christensen JP, Thomsen LE, Rubino S, et al. Effects of crp deletion in Salmonella enterica serotype Gallinarum. Acta Vet Scand 2007;49(1):14.
20. Pochop J, Kačániová M, Hleba L, Lopašovský Ľ, Rovná K, Arpášová H. Application of Real-time PCR for Rapid Petection of Salmonella spp, Salmonellaenterica ser Typhimurium and Enteritidis in Food Samples of Animal Origin without Pre-enrichment and with Pre-enrichment. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies2012; 45(1): 341-5.
21. Abernaty J, Corkill C, Hinojosa C, Li X, Zhou H. Deletions in the pyruvate pathway of. Salmonella TyphimuriumSPI1-mediated gene expression and infectivity. J Anim Sci Biotechnol 2013; 4(1):5: 1-12.
22. Gantois I, Ducatelle R, Timbermont L, Boyen F, Bohez L, Haesebrouck F, et al. Oral immunisation of laying henswith the live vaccine strains of TADSalmonella vac E and TAD Salmonella vac T reduces internal egg contamination withSalmonella enteritidis.Vaccine 2006; 24(37–39): 6250–5.
23. Springer S, Lindner T, Ahrens M, Woitow G, Prandini F, Selbitz HJ. Duration of immunity induced in chickens by anattenuated live Salmonella enteritidisvaccine and an inactivated Salmonellaenteritidis/typhimuriumvaccine. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2011;124(3–4): 89–93.

Original Article

GENERATION OF A GENE CONSTRUCT TO SIPA GENE DELETION OF SALMONELLA TYPHIMURIUM

Maasomeh Saki Hosseini[1], Abbas Doosti[2], Milad Pezeshki[3]

Received: 14 January, 2021; Accepted: 22 December, 2021

Abstract

Background & Aims: *Salmonella Typhimurium* is a negative-gram, non-spore, free capsule, moving bacteria with Trish Perry flagella. *Salmonella* is the most common cause of food poisoning. The ability to enter and survive in host cells is the condition for pathogenic *Salmonella* species. Proteins of invasive *Salmonella* are transferred to the host cells by bacteria. This study was performed for generation of a gene construct to *SipA* gene deletion of Salmonella Typhimurium and its cloning in *E.Coli* bacteria.

Materials & Methods: This laboratory study was conducted in biotechnology research center of Islamic Azad University Shahrekord Branch from September 2017 to May 2018. In this study, 5' and 3' sequence of *SipA* gene was amplified by the specific primers and PCR method. Then, each of these sequences was cloned by the T/A cloning method in pGEM-Teasy vector and then was transformed into *E.Coli* bacteria. Using the PCR method, the part related to each region was amplified and confirmed. The final confirmation of the produced construct was performed by the *Xbal* and *Xhol* enzymes.

Results: The results indicated the successful cloning of the target gene in *E.Coli* and generation of a gene construct with a length of the 1520 bp. Also, pET32 vector with a length of 5900 bp was the best vector for the admission construct.

***Conclusion*:** Based on the results, it seems that by inserting a gene, the damaged gene can be deleted and it can be used in the future research as a gene vaccine against *Salmonellosis*. Also, the target gene can be deleted with electroporation method and transferred into Salmonella Typhimurium, and due to the similarities between upstream and downstream gene sequences of sipA and Kan genes, homologous recombination between these two genes can occur and pathogenic genes will be removed.

Keywords: *SalmonellaTyphimurium*, gene construct*, E.Coli*, T/A cloning, *SipA*.

Address:Department of Genetics, Islamic Azad University, Biotechnology Research Center, Rahmatieh, Shahrekord, Iran
Tel: +983833361048
Email: abbasdoosti@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(8): 580 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2021 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[1] *Department of Genetics, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran*

[2] *Department of Genetics, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran (Corresponding Author)*

[3] *Department of Genetics, University of Arak, Arak, Iran*