Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.2, May 2017
Pages: 78-90

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۲، اردیبهشت ۱۳۹۶
صفحه: ۹۰-۷۸

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018

ایجاد سازواره ژنی برای دست‌کاری ژنتیکی سالمونلا انتریتیدیس در محل اختصاصی ژن *sipC*

مریم قاسمی[۱]، عباس دوستی[۲*]

چکیده

مقدمه: بیماری سالمونلوز بر اثر مصرف مواد غذایی آلوده به سالمونلا در انسان و حیوانات ایجاد می‌شود. سالمونلا، توان ایجاد عفونت خود را به واسطه داشتن ژن‌های بیماری‌زایی متعدد کسب کرده است. ژن *sipC* یکی از ژن‌های بیماری‌زایی سالمونلا است که پروتئین SipC را کد می‌کند. هدف از این پژوهش ایجاد یک کاست ژنی به منظور دست‌کاری ژنتیکی سالمونلا انتریتیدیس در محل ژن *sipC* هست.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، پس از استخراج DNA از سالمونلا، نواحی فرادست (up) و فرودست (down) ژن *sipC* به روش PCR، تکثیرو محصولات PCR به روش همسانه‌سازی T/A در وکتور pGEM درج شدند. به منظور ایجاد سازواره نهایی، هر یک از قطعات نواحی فرادست و فرودست ژن *sipC* به ترتیب در وکتور pET32 ساب کلون گردیدند و صحت کلونینگ با روش‌های PCR و هضم آنزیمی بررسی شد.

نتایج: تکثیر نواحی ۳۲۰ جفت بازی فرادست و ۲۰۶ جفت بازی فرودست ژن *sipC* با روش PCR با موفقیت انجام شد. همسانه‌سازی T/A این قطعات، سبب تشکیل دو وکتور نوترکیب pGEM-up و pGEM-down شد. نتایج تایید صحت ساب کلونینگ، موید تشکیل کاست ژنی نهایی pET32-up-down است.

نتیجه‌گیری: کاست ژنی ساخته شده در این مطالعه به عنوان یک کاست چند منظوره قادر به دست‌کاری اختصاصی ژن *sipC* سالمونلا به روش نوترکیبی همسان است. این سازواره ژنی از پتانسیل لازم برای حذف ژن *sipC* و یا درج هر ژن مفید و مؤثری به جای ژن *sipC*، برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا انتریتیدیس، کاست ژنی، ژن *sipC*

۱- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی
۲- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۸۱۷۰۹۶۶۸، پست الکترونیکی: abbasdoosti@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۲

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018

مقدمه

سالمونلا یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه است. باکتری سالمونلا، گرم منفی، میله‌ای شکل، فاقد اسپور، تاژک دار و متحرک و دارای تنفس بی‌هوازی اختیاری است. قطر این میکروارگانیسم در حدود ۰/۷ تا ۱/۵ میکرومتر و طولش از ۲ تا ۵ میکرومتر می‌رسد (۱). باکتری‌های جنس سالمونلا پاتوژن‌های درون سلولی اختیاری می‌باشند که در حیوانات خون گرم و خون سرد ایجاد بیماری می‌کنند و عفونت‌های حاصل از آن‌ها جزء بیماری‌های مشترک انسان و دام (zoonotic) است (۲،۳). سالمونلا انتریتیدیس موجب بیماری‌های خود محدود شونده روده‌ای با علائمی مانند تب، کرامپ شکمی و اسهال در انسان می‌گردد (۴). در واقع بیماری‌زایی سالمونلا در ارتباط با نواحی ویژه‌ای از کروموزوم این باکتری است که جزایر بیماری‌زایی سالمونلا (*Salmonella* Pathogenicity Island (SPI)) نام دارند (۵). در این جزایر ژن‌های بیماری‌زا، مانند *spv*، *rck*، *invA*، *mgtC*، *stn*، *sopE1*، *sopB*، *sefA* و *sipA-D* وجود دارند که به این پاتوژن برای مکانیسم‌های چسبندگی و تهاجم کمک می‌کنند (۶). پنج نوع اصلی این جزایر عبارت‌اند از: جزایر بیماری‌زای نوع یک، دو، سه، چهار و پنج (SPI-1، SPI-2، SPI-3، SPI-4، SPI-5). جزایر بیماری‌زایی یک و دو، ژن‌هایی را کد می‌کنند که محصول آن‌ها پروتئین‌های تشکیل دهنده سیستم ترشحی نوع III (Type 3 Secretion System (T3SS)) می‌باشند که توانایی انتقال مستقیم پروتئین‌های سالمونلا انتریکا از سلول باکتریایی به داخل سیتوزول سلول‌های یوکاریوتی را دارند (۷).

یکی از پروتئین‌هایی که سیستم ترشحی نوع III سالمونلا ترشح می‌کند، پروتئین تهاجمی سالمونلا (*Salmonella* Invasion Protein (Sip)) می‌باشد. این پروتئین به وسیله ژن *sip* کد می‌شود. چهار نوع پروتئین Sip به نام‌های SipA، SipB، SipC و SipD وجود دارد. پروتئین‌های SipB و SipC با لایه‌های لیپیدی مشابه در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) و نیز با غشای پلاسمایی سلول‌های میزبان در طی عفونت‌های سالمونلایی در داخل بدن (in vivo) در تعامل می‌باشند (۸). به نظر می‌رسد که SipB، SipC و SipD کانالی را در غشای سلول میزبان برای انتقال عوامل مؤثر SPI-1 سالمونلا در سلول میزبان تشکیل می‌دهند (۹).

پروتئین SipC از ۴۰۹ اسید آمینه تشکیل می‌شود، ۸۰ اسیدآمینه آن در ناحیه آب‌گریز مرکزی، ۱۲۰ اسید آمینه در ناحیه N-ترمینال و ۲۰۹ اسیدآمینه در ناحیه C-ترمینال قرار دارند (۱۰). هر دو دامین حاوی مارپیچ (coiled-coils) می‌باشند. دامین‌های N-ترمینال در ناحیه مجاور منطقه آب‌گریز غنی از پرولین، حاوی دو پلی پپتید مترادف یعنی SipC-N که شامل اسیدآمینه ۱-۱۲۰ و ۱۵ کیلودالتون است و SipC-C که شامل اسیدآمینه ۲۰۰-۴۰۹ و ۴۵ کیلو دالتون است، می‌باشند که به ترتیب به صورت مونومر و تریمر می‌باشند (۱۱).

محققین با استفاده از روشی به نام نوترکیبی همسان (Homologous recombination) اقدام به حذف ژن (Gene Knockout) برای غیرفعال کردن ژن‌ها می‌کنند. اساس این روش تخریب توالی کورموزومی ژن هدف با یک قطعه DNA غیر مرتبط و با استفاده از قالب حذفی (Deletion Cassette) حاوی ژن انتخابی مقاوم به آنتی‌بیوتیک، می‌باشد. نوترکیبی همسان بین دو انتهای DNA و کروموزوم حاوی ژن هدف صورت می‌گیرد و ژن هدف با ژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک جایگزین می‌شود، بدین ترتیب ژن هدف غیرفعال می‌گردد. سلول‌هایی که دستخوش تغییرات قرار گرفته‌اند روی محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک مورد نظر، کشت داده شده و خصوصیات آن‌ها مورد بررسی قرر می‌گیرد (۱۲). در مهندسی ژنتیک فرآیند نوترکیبی بسیار پر کاربرد است و با استفاده از آن می‌توان ژنوم موجودات مختلف را به موجودات دیگر وارد کرد و عملکرد آن‌ها را مورد بررسی قرار داد. (۱۳).

امروزه موارد متعددی از ایجاد و کاربرد کاست‌های حذف ژن در میکروارگانیسم‌های مختلف گزارش شده است. پس از کشف تکنیک‌های مهندسی ژنتیک، استفاده از پدیده نوترکیبی همسان با کمک کاست‌های ژنی، امکان دست-

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018

ورزی(Manipulation) مستقیم ژنوم موجودات را فراهم آورده است. در سال ۲۰۱۶، طی تحقیق انجام شده توسط Xia و همکاران، اقدام به دست‌کاری ژنتیکی لیستریا مونوسیتوژنز شد. این محققان با استفاده از تکنیک نوترکیبی همسان موفق به حذف یکی از ژن‌های لیستریا شدند. در این تحقیق سازه ژنی (Construct) ساخته شده، قادر به حذف ژن rsbX از ژنوم باکتری مذکور بود. (۱۴). در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۱۰ به انجام رسیده است، محققان با ایجاد یک کاست ژنی که حامل ژن کانامایسین بود موفق به حذف ژن و ایجاد باکتری یرسینیا پستیس جهش‌یافته شدند. آن‌ها کاست ژنی خود را بر پایه نوترکیبی همسان طراحی و در وکتور pKD46 ایجاد نمودند (۱۵). در سال ۲۰۱۱ محققان با ایجاد کاست‌های ژنی متعدد موفق به دست‌کاری ژنوم اشریشیاکلی انتروتوکسیزنیک در محل اختصاصی ژن‌های perA، perB، perB، epcH، ler، grlA و himA شدند (۱۶). در سال ۲۰۱۳ یک سیستم کاست تخریب ژنی برای باسیلوس تورنجینسیس طراحی شد. این کاست ژنی برای دستورزی ژنوم باکتری مذکور به روش نوترکیبی همسان به کار رفت و نتایج آن موفقیت‌آمیز بود (۱۷).

هدف از این تحقیق ایجاد کاست ژنی بر پایه وکتور pET32a(+) برای دست‌کاری ژنوم سالمونلا انتریتیدیس به روش نوترکیبی همسان بوده است. ژن sipC سالمونلا به عنوان ژن هدف در نظر گرفته شد و تغییرات ژنتیکی با توجه به آن طراحی و سازواره ژنی ایجاد شد. به این صورت که ابتدا نواحی فرادست و فرودست ژن *sipC* به روش PCR تکثیر شده و به صورت جداگانه به روش T/A cloning در وکتور T، کلون شدند. سپس طی دو مرحله در کنار هم و در وکتور pET32a(+) ساب کلون گردیدند. ناحیه فرادست بین دو سایت XbaI و BglII کلون می‌گردد و به دنبال آن ناحیه فرودست بین سایت‌های برشی SacI و XhoI درج می‌شود. بین این دو ناحیه نیز سایت‌های برش KpnI، NcoI، EcoRV، BamHI و EcoRI به عنوان یک MCS (مطابق نقشه وکتور pET32a(+)) باقی خواهند ماند.

روش بررسی

در این تحقیق نیمه تجربی آزمایشگاهی، از تکنیک‌های بیوانفورماتیک و مهندسی ژنتیک بهره گرفته شد که مراحل آن به صورت زیر است.

استخراج **DNA** ژنومی

DNA ژنومی از باکتری سالمونلا انتریتیدیس (سویه استاندارد) با استفاده از کیت استخراج DNA، شرکت سیناژن ایران (DNP^{TM} KIT) خالص‌سازی گردید. سپس غلظت و کیفیت DNA تخلیص شده با دستگاه نانودراپ (ND-1000 PeqLab) مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای مناطق فرادست و فرودست ژن *sipC* باکتری سالمونلا انتریتیدیس که در این تحقیق به ترتیب up و down نوشته شده‌اند، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، انجام شد. توالی مورد استفاده برای طراحی پرایمرها از بانک ژن جهانی به شماره ثبت CP016385 گرفته شد و پرایمرها با کمک نرم‌افزار Generunner طراحی شدند.

SipC-up-F: 5'-
ATGTCTAGACCCTAAATAAAGTGGCG -3'
SipC-up-R: 5'-
ATTAGATCTCTCCCTTTATTTTGGCAG -3'
SipC-down-F: 5'-
ATTGAGCTCTGACCACTGAAAGCCAC -3'
SipC-down-R: 5'-
ACACTCGAGTAATACCCAGACTTTCCG -3'

در انتهای '۵ هریک از پرایمر های SipC-up-F و SipC-up-R به ترتیب جایگاه برش آنزیم‌های محدودگر XbaI و *BglII* و نیز در سر '۵ هریک از پرایمرهای SipC-dwn-F و SipC-dwn-R به ترتیب جایگاه برش آنزیم‌های محدودگر *SacI* و *XhoI* به منظور سهولت کلون‌سازی در نظر گرفته شد. همان‌طور که در توالی پرایمرها ملاحظه می‌شود، زیر جایگاه برش این آنزیم‌ها خط

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018

کشیده شده است. واکنشگرهای مورد نیاز برای آزمون PCR که عبارت‌اند از ۲/۵ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰۰ نانوگرم)، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول dNTP MIX، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱/۵ میکرومول $MgCl_2$ و ۰/۵ واحد از آنزیم DNA Polymerase Smar-Taq و ۰/۵ واحد آنزیم pfu در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با یکدیگر مخلوط شدند. بلافاصله نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر ساخت کشور آلمان (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Germany) تحت برنامه دمایی زیر قرار داده شدند. به منظور واسرشت ابتدایی نخست مخلوط واکنشگرها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس چرخه‌های PCR در ۳۲ مرحله تکراری به صورت، واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ناحیه فرادست و ۶۳ درجه سانتی‌گراد برای ناحیه فرودست و طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد، تکثیر و طویل شدن نهایی در یک مرحله با شرایط دمایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه ادامه یافت.

استخراج **DNA** از ژل

پس از انجام آزمون PCR، الکتروفورز محصولات PCR مربوط به هر ناحیه بر روی ژل آگاروز ۱٪ دارای اتیدیوم بروماید انجام شد. با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل ساخت شرکت بایونیر کشور کره (Gel Extraction Kit, Bioneer, Korea)، قسمت‌های حاوی نواحی فرادست و فرودست ژن *sipC* سالمونلا انتریتیدیس از ژل، تخلیص شدند. برای اطمینان از صحت قطعات ژنی استخراج شده و بررسی کیفیت آن‌ها، مقدار ۳ میکرولیتر از آن‌ها روی ژل آگاروز ۱/۵٪ برده شد.

انجام **T/A Cloning**

محصولات PCR استخراج شده از ژل، مربوط به هر یک از نواحی فرادست و فرودست، به صورت جداگانه و به روش همسانه‌سازی T/A، کلون شدند. به این منظور از کیت شرکت پرومگا ساخت کشور آمریکا (pGEM T/A Cloning Kit) استفاده شد تا دو وکتور pGEM-up و pGEM-down به دست آیند. وکتور pGEM در ابتدا به صورت خطی می‌باشد و دارای یک نوکلئوتید T به صورت تک رشته در هر انتهای خود است و به همین علت T-vector نامیده می‌شود. از طرف دیگر، خاصیت بسیاری از آنزیم‌های DNA پلی مرازی این است که در دو انتهای محصول PCR، یک نوکلئوتید A بدون الگو و به صورت تک‌رشته‌ای قرار می‌دهند. از آنجا که A مکمل T است، می‌توان محصولات PCR را در وکتور T به راحتی کلون کرد و به این سیستم، کلون‌سازی T/A گویند. سپس محصولات کلون‌سازی T/A، در باکتری اشریشیاکلی سویه TOP10F ترانسفورم و باکتری‌های یاد شده در محیط LB-Agar حاوی ۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت و گرمخانه‌گذاری شدند. از کلنی‌های حاصل با استفاده از کیت تخلیص پلاسمید (ساخت شرکت Bioneer کشور کره جنوبی)، استخراج پلاسمید صورت گرفت. تایید صحت کلون‌سازی قطعات up و down ژن *sipC* در وکتورهای pGEM به روش‌های PCR و هضم آنزیمی بررسی شد.

ساب کلونینگ

از آنجا که هدف نهایی، ایجاد کاست ژنی در وکتور pET32a(+) (که برای سهولت نگارش در این مقاله به صورت pET32 نوشته شده است) می‌باشد، باید نواحی up و down به روش برش آنزیمی از وکتورهای pGEM-up و pGEM-down خارج گردند و به وکتور pET32 منتقل شوند. به این منظور ابتدا وکتور pET32 با دو آنزیم محدودگر XbaI و *BglII* برش داده شد تا به صورت خطی در آید. سپس وکتور نوترکیب pGEM-up نیز با همین دو آنزیم بریده شد تا قطعه up از آن خارج گردد. همه محصولات هضم آنزیمی روی ژل آگاروز، الکتروفورز شدند. قطعه DNA خطی مربوط به وکتور pET32 و قطعه DNA مربوط به ناحیه up از روی ژل با کمک تیغ اسکالپل بریده شدند و با کیت تخلیص DNA از ژل ساخت شرکت بایونیر کره جنوبی، خالص‌سازی گردیدند. واکنش اتصال (Ligation) بین قطعه up و وکتور pET32 با استفاده از آنزیم T4-لیگاز (ساخت شرکت سیناژن ایران) طبق پروتکل آنزیم و در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر حامل

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018

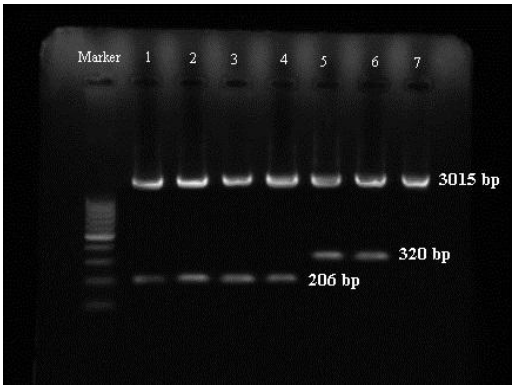
pET32، ۱۵ میکرولیتر قطعه ژنی مورد نظر، ۳ میکرولیتر بافر آنزیم T4 لیگاز، ۲ میکرولیتر آنزیم T4 لیگاز و ۵ میکرولیتر آب مقطر به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، انجام شد. محصولات اتصال مطابق روش بالا، در باکتری اشریشیاکلی، ترانسفرم شده و سپس تخلیص پلاسمید انجام شد. در این مرحله انتظار می‌رود که وکتور نوترکیب حاوی ناحیه up که به صورت pET32-up نشان داده می‌شود، تشکیل گردد.

برای اتصال قطعه down در وکتور نوترکیب pET32-up، ابتدا این وکتور با آنزیم‌های محدودگر *SacI* و *XhoI* بریده شد تا به صورت خطی در آید. سپس وکتور pGEM-down نیز با همین دو آنزیم بریده شد تا قطعه down مربوط به ژن *sipC* از آن خارج شود. کلیه مراحل مشابه با موارد ذکر شده برای قطعه up، انجام شد تا قطعه down نیز وکتور pET32-up درج شود و کاست نهایی pET32-up-down حاصل گردد. درستی تشکیل سازه نهایی به کمک هضم آنزیمی و با استفاده از آنزیم‌های *XbaI* و *XhoI* انجام شد. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد سرکار خانم مریم قاسمی با کد اخلاق مصوبه پایان نامه IR.IAUSHK.1393.5310 می‌باشد.

نتایج

استخراج DNA ژنومی از باکتری سالمونلا با موفقیت انجام شد و بررسی غلظت DNA با نانودراپ، نشان دهنده میزان ۷۲۰ نانوگرم در هر میکرولیتر بود. سپس در این پژوهش نواحی فرادست و فرودست ژن *sipC* باکتری سالمونلا انتریتیدیس با موفقیت از ژنوم باکتری، تکثیر و جداسازی شدند. به طوری که واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بخش‌های فرادست (up) و فرودست (down) ژن *sipC* موجب تکثیر قطعاتی به طول ۳۲۰ جفت باز مربوط ناحیه فرادست و ۲۰۶ جفت باز مربوط به ناحیه فرودست گردید.

کلون‌سازی محصولات PCR مربوط به هر یک از قطعات up و down به روش همسانه سازی T/A در حامل pGEM T-easy Vector، موجب تولید سازه‌های pGEM-up و pGEM-down گردید. با استفاده از تست‌های تاییدی PCR و هضم آنزیمی، مشخص شد که درصد زیادی از کلون‌های حاصل، دارای سازه‌های pGEM-up و pGEM-down می‌باشند. هضم آنزیمی دوگانه صورت گرفته با آنزیم‌های *XbaI* و *BglII* برای ناحیه فرادست و آنزیم‌های *SacI* و *XhoI* برای ناحیه فرودست روی پلاسمیدهای تخلیص شده، نشان دهنده حضور قطعات ۳۲۰ جفت بازی ناحیه فرادست و ۲۰۶ جفت بازی ناحیه فرودست ژن *sipC* در وکتورهای T، بود (شکل ۱).



شکل ۱: هضم آنزیمی وکتورهای نوترکیب pGEM-up و pGEM-down برای تایید صحت کلونینگ.

ستون‌های ۱ تا چهار، نشان دهنده وجود قطعات ۳۰۱۵ جفت بازی مربوط به وکتور pGEM و ۲۰۶ جفت بازی مربوط به قطعه down است. ستون‌های ۵ و ۶ نیز دارای دو قطعه ۳۰۱۵ و ۳۲۰ جفت باری به ترتیب مربوط به وکتور و قطعه up می‌باشد. ستون ۷ نیز وکتور pGEM فاقد هر گونه ژن کلون شده است. مارکر مورد استفاده نیز، DNA Ladder صد جفت بازی ساخت شرکت فرمنتاز است.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018

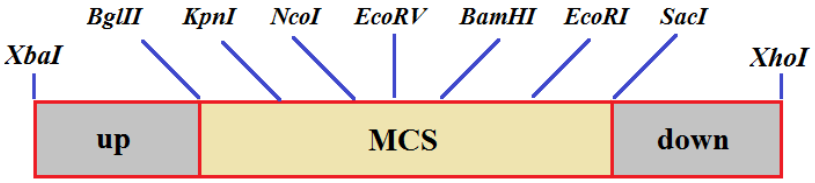
از آنجا که طراحی انجام شده برای ساخت کاست ژنی، بر پایه سایت‌های برش چندگانه (MCS: multiple cloning site) وکتور pET32 صورت پذیرفته بود، لذا نتایج ساب کلونینگ به صورت زیر است.

در این وکتور سایت‌های برش به ترتیب برای آنزیم‌های *XbaI*، *MscI*، *NspV*، *BglII*، *KpnI*، *NcoI*، *EcoRV*، *BamHI*، *EcoRI*، *SacI*، *SalI*، *HindIII*، *NotI*، *XhoI* در ناحیه MCS وجود دارند. سایت‌های برش آنزیمی XbaI و BglII در دو سمت قطعه up و سایت‌های SacI و XhoI در دو طرف قطعه down در نظر گرفته شد تا به سهولت در ناحیه MCS وکتور pGEM درج شوند. لذا همان‌طور که در بالا شرح داده شد، در سر '۵ پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر قطعات فرادست و فرودست، سایت برش آنزیمی مناسب در نظر گرفته شد. به منظور ساب کلونینگ ابتدا قطعه up از وکتور pGEM-up با هضم آنزیمی خارج شد و با موفقیت به وکتور pET32، منتقل گردید. بدین ترتیب وکتور نوترکیب pET32-up تشکیل شد. مرحله نهایی، درج قطعه down در پایین دست قطعه up و در محل مناسب بود. لذا در این مرحله، قطعه down با موفقیت از وکتور pGEM-down خارج در وکتور pET32-up درج گردید. نتایج PCR و هضم آنزیمی (شکل ۲) نشان دهنده درستی تشکیل کاست ژنی نهایی pET32-up-down است. همان‌طور که در شکل ۲ دیده می‌شود، هضم آنزیمی کاست نهایی برای هر یک از قطعات فرادست و فرودست به ترتیب خروج قطعات ۳۲۰ و ۲۰۶ جفت بازی را نشان می‌دهد. همچنین برش آنزیمی تاییدی برای کل کاست ژنی (up-MCS-down) با آنزیم‌های ابتدا و انتهای این سازه یعنی *XbaI* و *XhoI* نشان دهنده یک قطعه ۵۷۷ جفت بازی (به ترتیب برای مجموع ۲۰۶+۵۱+۳۲۰) است.

شکل ۲: هضم آنزیمی برای تایید ساخت کاست ژنی: ستون ۱: مارکر 1kb اینویتروژن (شماره کاتالوگ ۰۱۸-۱۰۷۸۷).
ستون ۲: هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pET32-up-down با دو آنزیم *XbaI* و *BglII* که قطعات ۳۲۰ و ۶۱۰۶ جفت بازی به ترتیب مربوط به قطعه up و وکتور pET32-down است. ستون ۳: هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pET32-up-down با دو آنزیم *SacI* و *XhoI* که قطعات ۲۰۶ و ۶۲۲۰ جفت بازی به ترتیب مربوط به قطعه down و وکتور pET32-up است. ستون ۴: هضم آنزیمی وکتور نوترکیب pET32-up-down با دو آنزیم *XbaI* و *XhoI* که قطعه ۵۷۷ جفت بازی مربوط به مجموعه up-MCS-down و قطعه ۵۸۵۰ جفت بازی مربوط به وکتور pET32 است.

همان‌طور که در الگوی شماتیک زیر دیده می‌شود، بین نواحی up و down ژن *sipC* که در وکتور pET32 درج شده اند، یک ناحیه MCS بسیار وسیع و مناسب شامل ۷ سایت برش آنزیمی باقی‌مانده است که برای درج ژن‌های جدید در این کاست و انتقال آن‌ها به ژنوم سالمونلا انتریتیدس، مناسب است (شکل ۳).

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018



شکل ۳: تصویر شماتیک کاست ژنی *sipC*. در دو طرف MCS، قطعات DNA مربوط به نواحی فرادست و فرودست ژن *sipC* قرار گرفته‌اند. در وسط این کاست نیز یک MCS مشتمل بر ۷ سایت برش آنزیمی وجود دارد.

بحث

سالمونلا انتریکا یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده عفونت‌های خود محدود شونده روده‌ای در انسان می‌باشد (۱۸). بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شد که دو سرووار این باکتری یعنی تایفی موریوم و انتریتیدیس شایع‌ترین علل ایجاد بیماری سالمونلوز هستند (۱۹). خاصیت بیماری‌زایی جنس سالمونلا در ارتباط با جزایر بیماری‌زای سالمونلا (*Salmonella* Pathogenicity Island) می‌باشد (۵). ژن *sipC* موجود در این جزایر، کد کننده پروتئین SipC است که این پروتئین در سلول میزبان عملکرد دوگانه دارد به طوری که موجب بسته‌بندی اکتین و تخریب اسکلت سلولی سلول میزبان می‌گردد. فعالیت‌های هسته اکتین SipC، نقش حیاتی را در تخریب غشایی ناشی از سالمونلا و به دنبال آن در تهاجم باکتری‌ها ایفا می‌کنند (۱۰).

در این پژوهش به منظور دست‌کاری ژنتیکی باکتری سالمونلا انتریتیدیس در محل اختصاصی ژن *sipC* و ساخت کاست ژنی، نواحی فرادست و فرودست ژن *sipC* باکتری سالمونلا اینتریتیدیس استخراج و در وکتور pGEM کلون و در کنار هم در حامل pET32 ساب کلون شدند. ناحیه فرادست بین دو سایت XbaI و BglII به دنبال آن ناحیه فرودست بین سایت‌های برشی sacI و XhoI در حامل pET32 درج شدند. مطابق نقشه حامل pET32 بین این دو ناحیه نیز سایت‌های برش KpnI، NcoI، EcoRV، BamHI و EcoRI وجود دارد.

کاست ژنی ایجاد شده در این پژوهش به دلیل وجود سایت‌های برش (MCS) می‌تواند برای حذف ژن *sipC* از باکتری سالمونلا مورد استفاده قرار گیرید. در واقع اضافه کردن هر گونه ژن طبیعی یا جهش یافته به ژنوم سالمونلا تحت پروموتر ژن *sipC* با کمک این کاست فراهم می‌گردد. لذا برای مطالعات پایه‌ای در خصوص رفتارهای مختلف سالمونلا از لحاظ رشد و بیان ژن در شرایط مختلف In Vivo و In Vitro، واکنش در مقابل انواع داروهای صنعتی و سنتی، شوک گرمایی و شوک سرمایی، فلزات سنگین، سموم، بررسی آن به عنوان یک باکتری گزارشگر در روده حیوانات آزمایشگاهی تحت تیمار با داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها و غیره فراهم است.

تا به امروز مطالعاتی برای شناسایی و حذف ژن‌های مؤثر در بیماری‌زایی سالمونلا مانند *sipA*، *crp*، *ace* صورت گرفته است اما بیشترین پژوهش‌ها در زمینه ژن *sipC* این باکتری به منظور شناسایی و اثبات این ژن در باکتری سالمونلا صورت گرفته است. در سال ۱۹۹۷ گیتر (Geyter) و همکاران با استفاده از روش تزریق سلولی نشان دادند که پروتئین SipC می‌تواند زمانی که در داخل سیتوزول سلول‌های پستانداران وجود دارد، موجب تخریب ساختار اکتین شود (۲۰). در سال ۱۹۹۸ ولچ (Welch) و همکاران پلی پپتیدهای SipC-N و SipC-C پروتئین SipC را در *E.coli* آزمایشگاهی و خالص شده مورد بررسی قرار دادند، مشخص شد که SipC-N و SipC-C به ترتیب به صورت مونومر و تریمر می‌باشند (۲۱). آن‌ها همچنین اثر SipC-N و SipC-C بر روی پلیمریزاسیون سینتتیک اکتین با استفاده از پیرن اکتین (pyrene-actin) و فلورسنت مشتقات اکتین در شرایط آزمایشگاهی اندازه‌گیری کردند، مشخص شد که دومین N-

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018

ترمینال پروتئین SipC بر روی تجمع سینتتیک اکتین تأثیری ندارد، درحالی‌که دومین C-ترمینال آن موجب افزایش پلیمریزاسیون سینتتیک اکتین می‌گردد (۲۱).

همچنین در سال ۲۰۰۰ هایوارد (Hayward) و همکاران مشخص کردند که پروتئین‌های SipB و SipC با لایه‌های لیپیدی و وابسته‌های لایه‌های لیپیدی در شرایط in vitro و نیز با غشای پلاسمایی سلول‌های میزبان در طی عفونت‌های سالمونلایی in vivo تعامل دارند (۸). در سال ۲۰۰۱ اوسیکی (Osiecki) و همکاران به بررسی ارتباطات عملکردی و بیوشیمیایی پروتئین‌های IpaC و SipC در شرایط in vitro پرداختند. مشخص شد که خصوصیات بیوشیمیایی مشابهی دارند ولی در خصوصیات عملکردی با یکدیگر تفاوت دارند (۲۲).

فعالیت‌های هسته اکتین ناشی از فعالیت جابجایی عامل مؤثر SipC در سال ۲۰۰۴ توسط جی‌هون (JiHoon) و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات آن‌ها نیز نشان داد که منطقه مرکزی برای فعالیت‌های هسته اکتین ضروری است و منطقه C-ترمینال اسیدآمینه برای انتقال عوامل مؤثر مورد نیاز است و فعالیت‌های هسته اکتین SipC، نقش حیاتی را در تخریب غشایی ناشی از سالمونلا و به دنبال آن در تهاجم باکتری‌ها ایفا می‌کنند (۱۰). بیوملر (Baumler) و همکاران در سال ۲۰۰۵ مطالعه را بروی ژن‌های *sipA*، *sopA*، *sopB*، *sopD* و *sopE2* باکتری سالمونلا انتریکا سرووار تایفی موریوم انجام دادند و به این نتیجه رسیدن که این ژن‌ها در تهاجم سالمونلا به سلول‌های اپیتلیال شرکت می‌کنند (۲۳). در سال ۲۰۰۷ پژوهشی روی حذف ژن *crp* از باکتری سالمونلا انتریکا سرووار گالیناروم توسط روسو (Rosu) و همکاران انجام شد، مشخص شد که حذف ژن *crp* سبب تولید واکسن علیه سالمونلا می‌شود (۲۴).

بر اساس مطالعه‌ای که توسط پنگ (Pang) و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی حذف زیر واحد E پیرووات دهید روژناز ژن *ace* انجام شد، مشخص شد که این حذف سبب کاهش گونه‌های باکتری در مرغ‌ها می‌شود (۲۵). در سال ۲۰۱۳ داروک (Doruk) و همکاران بر پایه سیستم نوترکیبی همسان، سازه ژنی برای حذف ژن از ژنوم باسیلوس نمودند، تکنیک‌های بکار رفته در راستای ایجاد سازواره ژنی مشابه کار ما اما نوع وکتورها، پرایمرها و ژن هدف با تحقیق ما تفاوت داشت (۱۷). اولوقلین (O'Loughlin) و همکاران در سال ۲۰۱۰ در جهت حذف تعدادی از ژن‌های باکتری یرسنیا پستیس، اقدام به تولید کاست ژنی حذفی نمودند. بیشتر کاست‌های ایجاد شده، عملکرد موفقیت‌آمیزی داشتند. تحقیق ما از لحاظ نوع باکتری و کانستراکت ساخته شده دارای تفاوت و از لحاظ تکنیک‌های بکار رفته و مسیر کار شباهت‌هایی با طرح مذکور دارد (۱۵).

در سال ۲۰۱۵ پئی (Pei) و همکاران با ساخت سازواره‌های ژنی و دست‌کاری ژنتیکی سالمونلا، این باکتری را وادار به بیان ژن‌های جدیدی از ویروس آنفلوانزا نمودند و از آن به عنوان واکسن خوراکی در موش‌ها علیه آنفلوانزاهای H5N1 و H1N1 بهره گرفتند. شباهت این تحقیق با تحقیق ما در استفاده از سالمونلا برای بیان ژن‌های خارجی است، در تحقیق ما نیز کاست ژنی جدیدی تولید شده است که قابلیت انتقال ژن‌های هدف را به درون ژنوم سالمونلا با اهداف مختلف دارد (۲۶). در سال ۲۰۱۱ مطالعاتی به منظور شناسایی ژن *sipC* در باکتری سالمونلا انجام گرفت. پارواتی (Parvathy) و همکاران در کشور هند مطالعه‌ای روی نمونه‌های کلینیکی و محیطی سالمونلا به منظور شناسایی و حضور ژن *sipC* انجام دادند و مشخص شد که ۹۵ تا ۱۰۰٪ سویه‌های جمع‌آوری‌شده دارای این ژن هستند (۲۷). همچنین مطالعه‌ای در زامبیا توسط مودندا (Mudenda) و همکاران برای شناسایی ژن *sipC* روی باکتری سالمونلا جمع‌آوری شده از نمونه‌های ماکیان و کلینیکی صورت گرفت و وجود ژن *sipC* در این نمونه‌ها تایید شد (۲۸).

در ایران نیز مطالعاتی روی باکتری سالمونلا انجام شده است. دوستی و شیرازی در سال ۲۰۱۲ موفق به کلون توالی‌های ۳' و ۵' ژن *sipA* باکتری سالمونلا اینتریکا سرووار انتریتیدس را در باکتری *E. coli* شدند (۲۹). در سال ۲۰۱۴ طاهر خانی و همکاران توانستند با موفقیت ژن *flic* باکتری سالمونلا انتریکا را در وکتور بیانی سلول‌های یوکاریوتی کلون کنند (۳۰). مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۵ توسط صالحی و محمدی روی ژن‌های *sipC* و *rfbjB* سویه‌های سالمونلا جدا

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018

شده از طیور در شهرستان ساری ایران انجام گرفت. حضور این ژن‌ها در باکتری‌های جداشده تایید شد و مشخص شد که می‌توان از روشی دقیق‌تر و سریع‌تر نسبت به PCR برای شناسایی و غربالگری سالمونلا استفاده کرد (۳۱). سازواره ژنی تولید شده در این تحقیق، با وجود داشتن مزایایی چون توانایی انتقال اختصاصی ژن‌های هدف به درون ژنوم سالمونلا، ممکن است با نقایص و کاستی‌هایی همراه باشد. با توجه به اینکه طول توالی‌های فرادست و فرودست ژن sipC مورد استفاده در این تحقیق در اندازه‌های ۲۰۶ و ۳۲۰ جفت باز تکثیر و کلون شده‌اند، به نظر اندکی کوتاه می‌آیند و اگر توالی‌های بلندتری انتخاب گردد، برای نوترکیبی همسان، مفیدتر خواهد بود. همچنین تعداد جایگاه‌های برش در ناحیه MCS کاست ژنی که ۵ عدد می‌باشد، ممکن است همچنان برای پذیرش برخی از ژن‌ها، تحقیقات را با محدودیت روبرو سازد و در صورتی که تعداد و تنوع بیشتری از این سایت‌های برش آنزیمی در این ناحیه درج گردد، وضعیت بهتری پیش خواهد آمد. هر چند موارد ذکر شده خللی در کاربرد این کاست ژنی برای دست‌کاری ژنتیکی سالمونلا در محل اختصاصی ژن sipC ایجاد نمی‌کنند.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، نواحی فرادست و فرودست ژن *sipC* سالمونلا، به عنوان یکی از ژن‌های مهم بیماری‌زایی در وکتورهای T درج گردید. به دنبال آن یک کاست ژنی مناسب به صورت up-MCS-down بر پایه وکتور pET32 ساخته شد. با توجه به کارآمدی سیستم نوترکیبی همسان (Homologous recombination) که به صورت طبیعی در باکتری‌ها اتفاق می‌افتد، هر ژنی که در داخل MCS این کاست ژنی درج گردد، امکان انتقال و جایگزینی در محل اختصاصی ژن sipC سالمونلا را دارد. به نظر می‌رسد که می‌توان از کاست ژنی تولید شده در این مطالعه برای حذف ژن *sipC*، بررسی رفتارهای مختلف سالمونلا مثلاً واکنش در مقابل انواع داروهای صنعتی و سنتی، شوک گرمایی و شوک سرمایی، فلزات سنگین، سموم، بررسی آن به عنوان یک باکتری گزارشگر در روده حیوانات آزمایشگاهی تحت تیمار با داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها و غیره بهره جست. همچنین می‌توان ژن‌های مفیدی نظیر ژن‌های کد کننده آنزیم‌ها یا ژن‌های کد کننده آنتی‌ژن‌ها (با هدف ایجاد واکسن) را در این کاست درج نمود و از آن برای انتقال این ژن‌ها به ژنوم سالمونلا و ایجاد سویه مهندسی ژنتیک شده پایدار استفاده کرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد است. نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد به دلیل حمایت‌های علمی و آزمایشگاهی اعلام می‌دارند.

References:

1- Velge P, Wiedemann A, Rosselin M, Abed N, Boumart Z, Chausse AM, et al. ***Multiplicity of Salmonella entry mechanisms, a new paradigm for Salmonella pathogenesis.*** Microbiologyopen 2012; 1(3): 243-58.

2- Jacobsen A, Hendriksen RS, Aaresturp FM, Ussery DW, Friis C. ***The Salmonella enterica Pan-genome.*** Microb Ecol 2011; 62(3): 487-504.

3- Safari Foroshani N, Karami A, Pourali F. ***Simultaneous and rapid detection of Salmonella typhi, Bacillus anthracis and Yersinia pestis by using Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR).*** Iran Red Crescent Med J 2013; 15(11): e9208.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018

4- Silva CA, Blondel CJ, Quezada CP, Porwollik S, Andrews-Polymenis HL, Toro CS, et al. ***Infection of mice by Salmonella enterica serovar Enteritidis involves additional genes that are absent in the genome of serovar Typhimurium.*** Infect Immun 2012; 80(2): 839-49.

5- Porwollik S, Wong RM, McClelland M. ***Evolutionary genomics of Salmonella: gene acquisitions revealed by microarray analysis.*** Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(13): 8956-61.

6- Zou M, Keelara S, Thakur S. ***Molecular characterization of Salmonella enterica serotype Enteritidis isolates from humans by antimicrobial resistance, virulence genes and pulsed-field gel electrophoresis.*** Foodborne Pathog Dis 2012; 9(3): 232-38.

7- Rychlik I, Karasova D, Sebkova A, Volf J, Sisak F, Havlickova H, et al. ***Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of Salmonella enterica serovar Enteritidis for chickens.*** BMC Microbiol 2009; 9: 268.

8- Hayward RD, McGhie EJ, Koronakis V. ***Membrane fusion activity of purified sipB, a Salmonella surface protein essential for mammalian cell invasion.*** Mol Microbiol 2000; 37(4): 727-39.

9- Scherer CA, Cooper E, Miller SI. ***The Salmonella type III secretion translocon protein SipC is inserte into the epithelial cell plasma membrane upon infection.*** Mol Microbiol 2000; 37(5): 1133-45.

10- Chang J, Chen J, Zhou D. ***Delineation and characterization of the actin nucleation and effector translocation activities of Salmonella SipC.*** Mol Microbiol 2005; 55(5): 1379-89.

11- Hayward RD, Koronakis V. ***Direct nucleation and bundling of actin by the SipC protein of invasive Salmonella.*** EMBO J 1999; 18(18): 4926-34.

12- Geng SZ, Jiao XA, Pan ZM, Chen XJ, Zhang XM, Chen X. ***An Improved Method to Knock Out the asd Gene of Salmonella enterica Serovar Pullorum.*** J Biomed Biotechnol 2009; 646380-8.

13- Nern A, Pfeiffer BD, Svoboda K, Rubin GM. ***Multiple new site-specific recombinases for use in manipulating animal genomes.*** Proc Natl Acad Sci USA 2011; 108(34): 14198-203.

14- Xia Y, Xin Y, Li X, Fang W. ***To Modulate Survival under Secondary Stress Conditions, Listeria monocytogenes 10403S Employs RsbX To Downregulate σB Activity in the Poststress Recovery Stage or Stationary Phase.*** Appl Environ Microbiol 2015; 82(4): 1126-35.

15- O'Loughlin JL, Spinner JL, Minnich SA, Kobayashi SD. ***Yersinia pestis two-component gene regulatory systems promote survival in human neutrophils.*** Infect Immun 2010; 78(2): 773-82.

16- Bustamante VH, Villalba MI, García-Angulo VA, Vázquez A, Martínez LC, Jiménez R, et al. ***PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic Escherichia coli.*** Mol Microbiol 2011; 82(2): 398-415.

17- Doruk T, Gedik ST. ***An efficient gene deletion system for Bacillus thuringiensis.*** Biologia 2013; 68(3): 358-64.

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018

18- Betancor L, Schelotto F, Martinez A, Pereira M, Algorta G, Rodriguez MA, et al. ***Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of Salmonella enterica serovar Enteritidis isolates collected from humans and Poultry in Uruguay.*** J Clin Microbiol 2004; 42(3): 1155-62.

19- Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, et al. ***Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of Salmonella in human clinical samples.*** J Clin Microbiol 2004; 42(4): 1734-8.

20- De Geyter C, Vogt B, Benjelloun-Touimi Z, Sansonetti PJ, Ruysschaert JM, Parsot C, et al. ***Purification of IpaC, a protein involved in entry of Shigella flexneri into epithelial cells and characterisation of its interaction with lipid membranes.*** FEBS Lett 1997; 400(2): 149-54.

21- Welch MD, Rosenblatt J, Skoble J, Portnoy DA, Mitchison TJ. ***Interaction of human Arp2/3 complex and the Listeria monocytogenes ActA protein in actin filament nucleation.*** Science 1998; 281(5373): 105-8.

22- Osiecki JC, Barker J, Picking WL, Serfis AB, Berring E, Shah S, et al. ***IpaC from Shigella and sipC from Salmonella possess similar biochemical properties but are functionally distinct.*** Mol Microbiol 2001; 42(2): 469-81.

23- Raffatellu MR, Wilson P, Chessa D, Andrews-Polymenis H, Tran QT, Lawhon S, et al. ***SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 contribute to Salmonella enterica serotype Typhimurium invasion of epithelial cells.*** Infect Immun 2005; 73(1): 146-54.

24- 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: 14.

25- Pang E, Tien-Lin C, Selvaraj M, Chang J, Kwang J. ***Deletion of the aceE gene (encoding a component of pyruvate dehydrogenase) attenuates Salmonella enterica serovar Enteritidis.*** FEMS Immunol Med Microbiol 2011; 63(1): 108-18.

26- Pei Z, Jiang X, Yang Z, Ren X, Gong H, Reeves M, et al. ***Oral Delivery of a Novel Attenuated Salmonella Vaccine Expressing Influenza A Virus Proteins Protects Mice against H5N1 and H1N1 Viral Infection.*** PLoS One 2015; 10(6): e0129276.

27- Parvathi A, Vijayan J, Murali G, Chandran P. ***Comparative virulence genotyping and antimicrobial susceptibility profiling of environmental and clinical Salmonella enterica from Cochin, India.*** Curr Microbiol 2011; 62(1): 21-6.

28- Mudenda HB, William U, James M, Charles M, Nayuta I, Evans M, et al. ***Feasibility of using dot blot hybridization to detect salmonella invA, sipc, directly from clinical specimens.*** Afr J Microbiol 2011; 5(6): 582-5.

29- Shirazi G, Doosti A. ***Cloning and sequencing 5' and 3' SipA gene of Salmonella enteritidis in E.coli.*** JFM 2016; 2(4): 29-37. [Persian]

30-Taherkhani R, Farshadpour F, Makvandi M, Samarbafzadeh AR. ***Cloning of fliC gene from Salmonella typhimurium in the expression vector pVAX1 and evaluation of its expression in Eukaryotic cells.*** Jundishapur J Microbiol 2014; 7(11): e12351.

31-Salehi M, Mohammadi S. ***spiC and rfbjB genes studies in isolated Salmonella strains from poultry in Sari.*** J Vet Clin Res 2015; 5(2): 9-18. [Persian]

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018

Generation of a gene cassette for genetically engineered *Salmonella* Enteritidis in the specific region of the *sipC* gene

Maryam Ghasemi [1], Abbas Doosti [*2]

[1,2] Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 19 Oct 2016 **Accepted:** 22 Dec 2016

Abstract

Introduction: Salmonellosis is an infection caused by eating contaminated food with Salmonella, and it can occur in humans and other animals. Salmonella has acquired the ability to create the infection due to the presence of several virulence genes. One of the virulence genes of salmonella is sipC gene that coding the SipC protein. The aim of this study was creating the gene cassette to genetically engineered Salmonella enteritidis in the specific region of the sipC gene.

Methods: In this study, after DNA extraction from Salmonella, the upstream and downstream regions of the sipC gene was amplified based on PCR method. The PCR products were cloned with T/A cloning method and they were inserted into the pGEM vector. In order to generate the final gene cassette, each of the upstream and downstream regions of the sipC gene was subcloned into the pET32 vector, and cloning accuracy was assessed by PCR and enzyme digestion methods.

Results: Amplification of the 320 bp upstream and 206 bp downstream of sipC gene was successful by PCR method. T/A cloning of these fragments were caused the formation of two pGEM-up and pGEM-down recombinant vectors. Results that were confirmed the sub-cloning accuracy indicate the formation of the final pET32-up-down gene cassette.

Conclusion: The generated gene cassette in this study was considered as a multi-purpose cassette that is able to specific gene manipulation of Salmonella sipC gene by homologous recombination matched. This gene cassette has the necessary potential for sipC gene deletion or insertion of any useful gene instead of sipC gene.

Keywords: Salmonella Enteritidis; Gene Cassette; sipC gene

This paper should be cited as:

Ghasemi M, Doosti A. **Generation of a gene cassette for genetically engineered *Salmonella* Enteritidis in the specific region of the *sipC* gene.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(2): 78-90.

***Corresponding author: Tel: 09181709668, email: abbasdoosti@yahoo.com**

Downloaded from jssu.ssu.ac.ir at 17:49 IRST on Sunday January 21st 2018