Journal of Police Medicine

Summer 2013; Vol. 2, No. 2: 127-138

Original Article

Deletion of Perosamine Synthetase Gene in Brucella Melitensis Rev1 to Generate the Attenuated Mutant Strain

Received: 30 May 2013 **Revised:** 5 August 2013 **Accepted:** 6 August 2013

Ali Reza Saeedinia[1]
Mehdi Zeinoddini[2]
Masood Soleimani[3]
Majid Sadeghizadeh[4*]

[1]Ph.D Student of Molecular Genetic, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Assistant Professor, Biochemistry, Department of Bioscience and Biotechnology, Mallek-Ashtar University of Technology, Tehran, Iran
[3]Associate Professor, Hematology, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[4]Full Professor, Molecular Genetic, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

ABSTRACT

Background: The aim of this study was to employ gene knockout technique in Brucella melitensis *Rev1* to attain the attenuated mutant strain. Therefore, we deleted the *perosamine synthetase* encoding gene (*per*), one of the LPS O-chain coding genes, by homologous recombination.

Materials and Methods: Homologous recombination was performed using a suicide vector containing deletion cassette, which comprised kanamycin resistance sequence (kan^R) flanking with the *per* upstream and downstream sequences. Deletion cassette was constructed by PCR reactions using specific primers, and cloned into pBluescriptIISK(-) to construct suicide vector. The suicide vector was transformed into Brucella by electroporation.

Results: The results were confirmed deletion cassette and suicide vector construction. After mutant strain selection, deletion of the *per* gene was confirmed by PCR using specific primers, and sequencing. Also, loss of the *per* gene function was confirmed by comparison of RT-PCR products from wild type and mutant strain.

Conclusion: The mutant *Brucella* had deficiency in its LPS O-chain structure, so in addition to reduce error in diagnostic tests to discriminate between vaccinated and infected animal, it can to characterize as a candidate vaccine with later immunological tests.

Key words: brucella melitensis Rev1, gene deletion, perosamine synthetase, suicide vector

[*]**Corresponding Author:**
Professor, Molecular Genetic, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Tel : (+98) 21 8288 4484
Email: sadeghma@modares.ac.ir

تابستان ۱۳۹۲ – شماره ۲ – مسلسل ۲– صفحات ۱۲۷–۱۳۸

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

حذف ژن پروزامین سنتتاز در باکتری بروسلا ملی تنسیس Rev1 بمنظور تولید سویه ضعیف شده

تاریخ دریافت: ۹ خرداد ۱۳۹۲ **تاریخ اصلاح:** ۱۴ مرداد ۱۳۹۲ **تاریخ پذیرش:** ۱۵ مرداد ۱۳۹۲

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه، انجام حذف ژنی در باکتری *بروسلا ملی تنسیس Rev*[1] به منظور دستیابی به یک سویه تضعیف شده، بود. بدین منظور تلاش گردید تا ژن کدکننده آنزیم *پروزامین سنتتاز* (*per*)، یکی از ژن‌های درگیر در تشکیل ساختار زنجیره O از LPS دیواره باکتری، از طریق انجام نوترکیبی همساخت حذف گردد.

مواد و روش‌ها: نوترکیبی همساخت با استفاده از وکتور خودکشی حامل کاست حذف که شامل ترادف نوکلئوتیدی کدکننده مقاومت آنتی بیوتیکی کانامایسین (*kan*^{R}) بهمراه ترادف‌های بالادست و پایین دست ژن *per* در طرفین آن بود، صورت گرفت. کاست حذف با انجام واکنشهای PCRسه مرحله‌ای با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ساخته شده و به منظور ساخت وکتور خودکشی، درون وکتور pBluescriptIISK(-) کلون گردید. انتقال وکتور خودکشی بدرون باکتری با روش الکتروپوریشن صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل، صحت ساخت کاست حذف و وکتور خودکشی را تأیید کرد. به دنبال انتخاب سویه جهش یافته، حذف ژن *per* با انجام واکنش‌های PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و تعیین توالی قطعه تکثیر یافته، مورد تأیید قرار گرفت. همچنین با مقایسه محصول واکنشهای RT-PCR انجام یافته با پرایمرهای اختصاصی از سویه‌های والد و جهش یافته، عدم بیان آنزیم *پروزامین سنتتاز* مورد تأیید قرار گرفت.

بحث و نتیجه‌گیری: سویه حاصل یک سویه جهش یافته دارای نقص در ساختار LPS خود بوده که علاوه بر کاهش خطا در تمایز ما بین حیوان واکسینه شده و حیوان آلوده در تست‌های تشخیصی، می‌تواند با انجام تست‌های ایمنولوژیکی بعنوان یک سویه کاندید واکسن مورد بررسی قرار بگیرد.

کلید واژه‌ها: بروسلاملی‌تنسیس Rev1، پروزامین سنتتاز، حذف ژنی، وکتور خودکشی

علی رضا سعیدی نیا[1]
مهدی زین الدینی[2]
مسعود سلیمانی[3]
مجید صادقی زاده[4*]

[1]دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[2]استادیار، بیوشیمی، گروه ژنتیک، پژوهشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران
[3]دانشیار، هماتولوژی، گروه هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[4]استاد، ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[*]نویسنده مسئول:
استاد، ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
تلفن:۲۱۸۲۸۸۴۴۰۹(۹۸+)
پست الکترونیک:
sadeghma@modares.ac.ir

مقدمه

بروسلا یکی از باکتری‌های گروه آلفا پروتئو باکتریا[1] می‌باشد که یک عامل عفونی در پستانداران به شمار می‌رود و از حیوان به انسان نیز منتقل می‌گردد. بیماری ناشی از باکتری بروسلا تحت عنوان بروسلوز[2] (تب مالت) خوانده می‌شود و تقریباً در اکثر نقاط دنیا دیده می‌شود. باکتری بروسلا برخلاف سایر ارگانیسم‌ها، عوامل و فاکتورهای تهاجمی مانند کپسول، فلاژل، اگزوتوکسین، سیتولیزین‌ها و سایر عوامل تهاجمی را ندارد. لیکن داشتن

[1]: α-Proteobacteria, [2]:Brucellosis

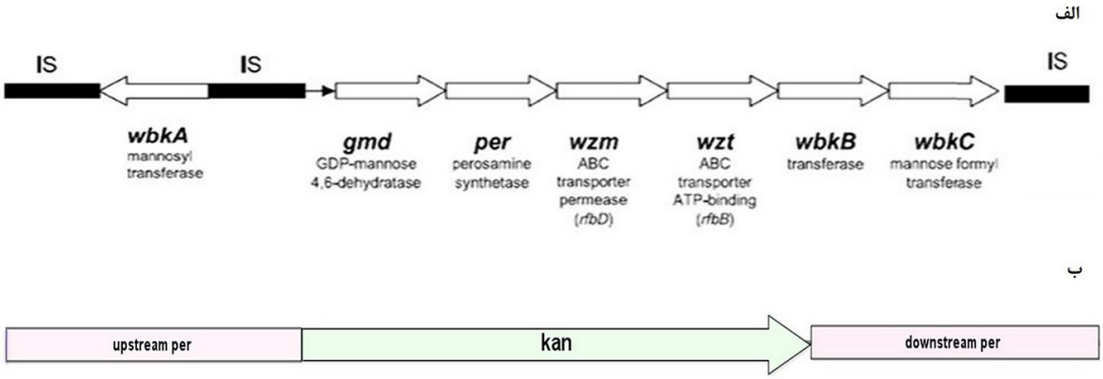
Journal of Police Medicine
Summer 2013; Vol. 2, No. 2: 127-138

خصوصیات مهم دیگری باعث شده است که این باکتری بتواند در درون میزبان باقی بماند و تکثیر کند [۲ و۱]. بروسلا مکانیسم مرگ سلولی را مهار می‌کند و بدون اینکه تداخلی در فرآیند میتوزی سلول میزبان ایجاد کند، همانندسازی کرده و تکثیر می‌یابد [۳]. این باکتری درون سلول‌های فاگوسیت اختصاصی و غیر اختصاصی مخفی می‌ماند و در درون اجزایی که شباهت به شبکه آندوپلاسمی دارد تکثیر می‌یابد. بافت تروفوبلاست جفت بعنوان میزبان دوم باکتری به حساب می‌آید. باکتری در داخل ماکروفاژ در اجزایی به نام فاگوزوم تکثیری باقی می‌ماند و تکثیر می‌یابد. فاگوزوم تکثیری[1] در حقیقت از تعامل بین واکوئل حاوی بروسلا و شبکه آندوپلاسمی ماکروفاژ میزبان ایجاد می‌گردد [۸-۴]. با وجود باقی ماندن باکتری در داخل فاگوزوم، این باکتری در آن محیط در معرض فقر و کمبود مواد غذایی طولانی مدت قرار می‌گیرد و تحمل می‌کند [۱۱-۹]. لیپوپلی‌ساکارید[2] بروسلا خصوصیات ویژه‌ای را به این باکتری می‌دهد. به عنوان مثال، LPS بروسلا فعالیت بیولوژیک کمتری ایجاد می‌کند و بنابراین مکانیسم‌های کشندگی داخل سلولی را تحریک نمی‌کند [۱۴-۱۲]. در بروسلا وجود LPS از نوع صاف[3] (S-LPS) باعث حفاظت باکتری در برابر کشته شدن و از بین رفتن به واسطه سیستم کمپلمان می‌گردد. همچنین تعامل بین LPS باکتری با چربی‌های موجود در سطح ماکروفاژ از اتصال فاگوزوم حاوی بروسلا به لیزوزوم در داخل ماکروفاژ جلوگیری می‌کند. در حقیقت به نظر می‌رسد که S-LPS باکتری بروسلا نقش مهمی در شروع تشکیل و باقی ماندن فاگوزوم حاوی بروسلا، ایفا می‌کند. همچنین ثابت شده است که S-LPS در باکتری بروسلا باعث تعدیل و کاهش فعالیت سیستم ایمنی می‌گردد و این مکانیسم باعث می‌شود که باکتری بتواند مدت زمان طولانی در درون ماکروفاژ میزبان باقی بماند [۱۶ و۱۵]. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که ژن‌های مختلفی در سنتز آنتی ژن O از LPS (O-PS) در باکتری بروسلا نقش دارند و این ژن‌های سنتز کننده O-PS در یک ناحیه مجزا تجمع یافته‌اند که به نام ناحیه wbk خوانده می‌شود (شکل ۱-الف) [۱۷]. از جمله این ژن‌ها، ژن per می‌باشد که آنزیمی به نام پروزامین سنتتاز[4] را کد می‌کند که باعث سنتز پروزامین از GDP - مانوز می‌گردد که در ساختار زنجیره O (آنتی ژن O) از ساختان LPS نقش دارد [۱۸]. جهش در ژن‌های کدکننده زنجیره O منجر به تولید سویه خشن بروسلا[5] (R-LPS) می‌گردد. این نمونه‌های جهش یافته علاوه بر کاهش بیماری‌زایی، در واقع تولید آنتی‌بادی ضد O-PS نمی‌کنند و با آنتی بادی اختصاصی O-PS نیز واکنش نشان نمی‌دهند، لذا این قسمت کاندید مناسبی جهت تولید باکتری ضعیف شده می‌باشد [۲۲-۱۸]. در این مطالعه، ما تلاش به انجام ناک اوت ژنی[6] بر اساس نوترکیبی همساخت[7] با استفاده از وکتور خودکشی[8]، در باکتری بروسلا ملی تنسیس[9] سویه Rev1 بمنظور تولید سویه جهش یافته ضعیف شده داشتیم. برای این منظور، ما ژن per را که یکی از ژن‌های درگیر در تشکیل ساختار زنجیره O از LPS دیواره باکتری می‌باشد، هدف قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و شرایط کشت

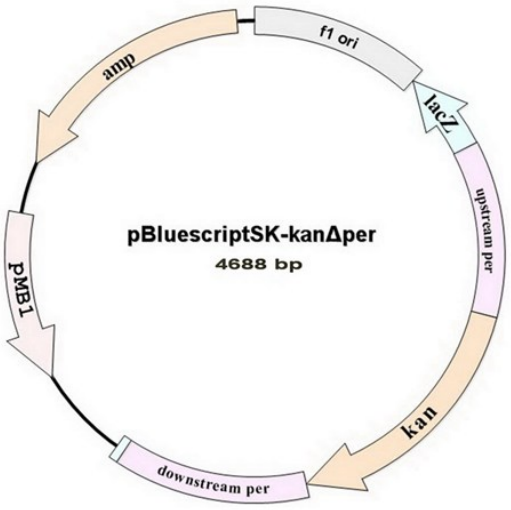
باکتری بروسلا ملی تنسیس سویه واکسن Rev۱ از داروخانه اداره دامپزشکی تهیه شد. باکتری Rev۱ در محیط‌های کشت مایع TSB و جامد TSA (Fluka) کشت داده شد. کشت TSB با دوز مناسب از سویه Rev۱ بمدت ۹۶-۷۲ ساعت در دمای ۳۷°C صورت گرفت. پلیت‌های TSA بمدت ۶-۴ روز تحت دمای ۳۷°C و فشار CO_2 ۵٪ قرار گرفتند. باکتری اشریشیا کلی TOP۱۰F′ در محیط‌های کشت مایع و جامد LB (Fluka) تحت دمای ۳۷°C و بمدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. مواد شیمیایی و آنتی بیوتیک‌های موردنظر در غلظت‌های نهایی زیر به محیط‌های کشت اضافه شدند: کانامایسین ۳۰μg/ml (Roche)، آمپی سیلین ۵۰μg/ml (



شکل ۱: (الف) تصویر شماتیک از موقعیت ژن per در اپرون O-PS و (ب) کاست حذف

[1:] Replicative phagosome, [2:] lipopolysaccharide (LPS), [3:] Smooth-LPS, [4:] Perosamine synthetase, [5:] Rough-LPS, [6:] Gene knockout, [7:] Homologous recombination, [8:] Suicide vector, [9:] Brucella melitensis

مجله طب انتظامی
تابستان ۱۳۹۲ - شماره ۲ - مسلسل ۲- صفحات ۱۲۷-۱۳۸



شکل ۲: تصویر شماتیک وکتور خودکشی

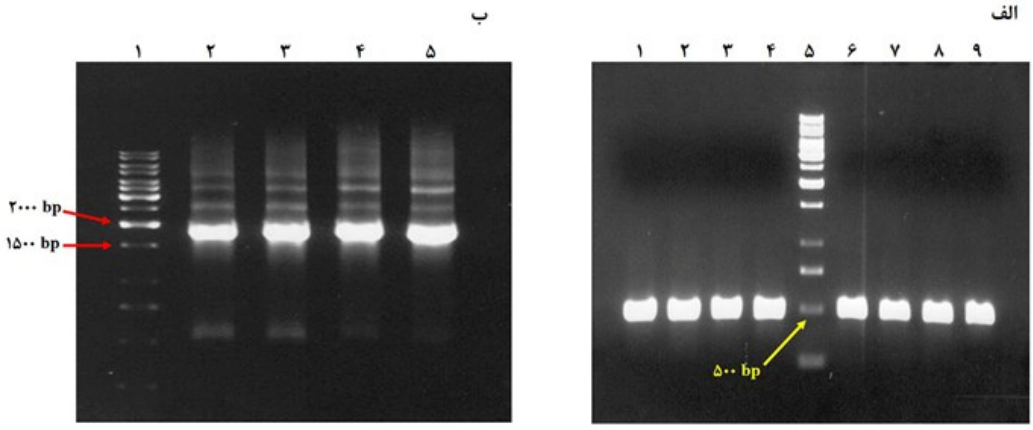
(Roche)، ۳۰µg/ml IPTG (Roche) و ۳۰µg/ml X-Gal (Roche).

استخراج مولکول‌های DNA و RNA

مولکول‌های DNA ژنومی و پلاسمیدی با استفاده از کیت‌های تجاری و با دستورالعمل ارائه شده بوسیله شرکت سازنده (Bioneer) استخراج شدند. مولکول‌های RNA کل سلولی با استفاده از کیت تخلیص GeneJET™ و با دستورالعمل ارائه شده بوسیله شرکت سازنده (Fermentas) استخراج شد. نمونه‌های RNA استخراج شده بمنظور حذف آلودگی DNA، بمدت ۳۰ دقیقه تحت دمای ۳۷°C با آنزیم DNaseI (Fermentas) تیمار شد. بعد از غیرفعال‌سازی آنزیم، تصفیه نمونه‌های RNAطبق دستورالعمل کیت صورت گرفت. صحت اندازه و کامل بودن مولکول‌های RNA کل با استفاده از ژل الکتروفورز چک شد. مولکول‌های DNA و RNA استخراج شده، با استفاده از اسپکتروفتومتر تعیین غلظت گردیده و تا زمان استفاده بترتیب در دماهای منهای ۲۰ و ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

طراحی و ساخت کاست حذف

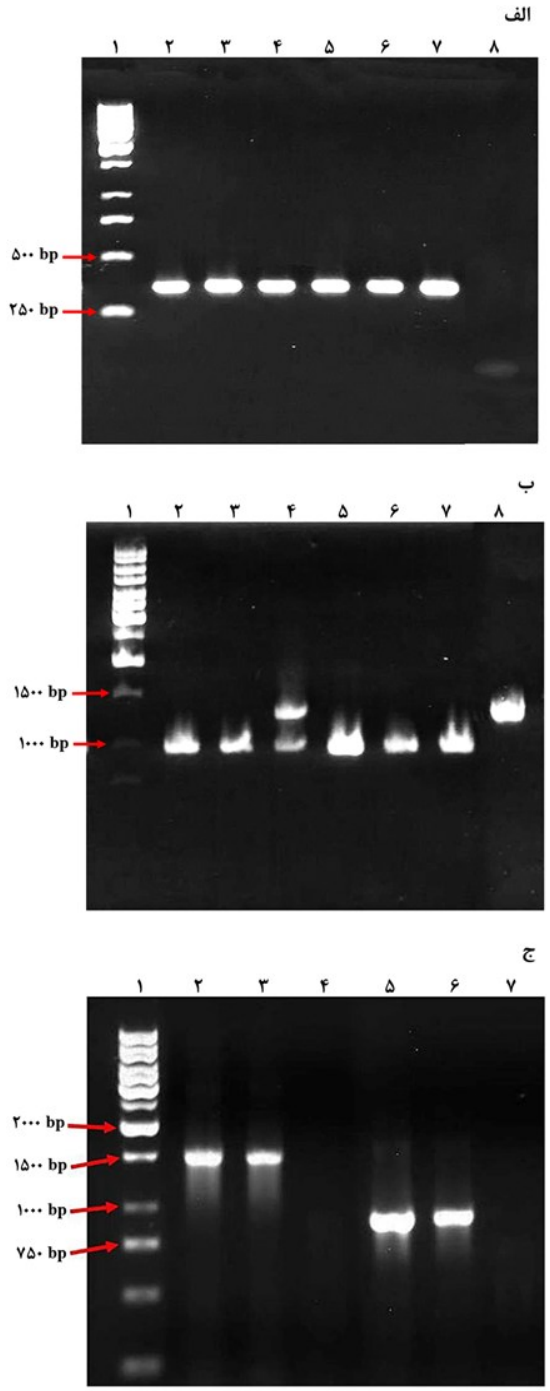
کاست حذف[1] با استفاده از ترادف‌های موجود در بانک ژنی برای بالادست و پایین‌دست ژن per (توالی ژنوم Rev۱، EQ۹۹۹۵۶۱) و ترادف نوکلئوتیدی کدکننده مقاومت آنتی‌بیوتیکی کانامایسین (توالی وکتور pET۲۸a، X۰۶۴۰۴) طراحی شد. ساخت کاست حذف بر اساس روش PCR سه مرحله‌ای، از روی ژنوم سویه Rev۱ و وکتور بیانی pET۲۸a (Fermentas) بعنوان الگو و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و آنزیم Pfu DNA polymerase (Roche) صورت گرفت [۲۳]. طراحی پرایمرها براساس ترادف‌های فوق صورت گرفت و آنالیز پرایمرها به وسیله برنامه Gene Runner (Hastings Software, Inc.) انجام شد. در این روش دو پرایمر خارجی و دو پرایمر داخلی طراحی شد (جدول ۱). پرایمرهای داخلی به گونه‌ای طراحی شدند که از یک طرف (انتهای ۳′) با نواحی نوکلئوتیدی در بالا دست و پائین دست ژن per تشابه توالی داشتند و از طرف دیگر (انتهای ۵′) با توالی دو انتهای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین تشابه توالی داشتند. بدین ترتیب با انجام PCR سه مرحله‌ای کاست حذف بنحوی سنتز شد که در آن ژن مقاومت به



شکل ۳: ساخت کاست حذف بر اساس روش PCR سه مرحله‌ای. (الف) واکنش‌های PCR بر روی DNA ژنومی سویه Rev1 برای تکثیر ترادف‌های بالادست و پایین‌دست per: ستون‌های ۱ تا ۴، تکثیر با پرایمرهای F1 و SPR۳ (۴۷۰bp)، ستون ۵، ۱kb DNA ladder و ستون‌های ۶ تا ۹، تکثیر با پرایمرهای SPF۳ با R1(۴۸۷bp). (ب) واکنش PCR بر روی مجموعه محصول تکثیر شده در مرحله قبل و ترادف kan برای سنتز کاست حذف: ستون ۱، ۱kb DNA ladder و ستون‌های ۲ تا ۵، تکثیر با پرایمرهای F1 و R1 (۱۷۲۷bp).

[1]: Deletion cassette

Journal of Police Medicine
Summer 2013; Vol. 2, No. 2: 127-138



شکل ۴: بررسی حذف per در سویه‌های جهش‌یافته بوسیله PCR. (الف) واکنش PCR با پرایمرهای FK۱ و R۲: ستون ۱، kb DNA ladder۱، ستون‌های ۲ تا ۷، PCR در سویه‌های جهش‌یافته (۳۵۴bp) و ستون ۸، PCR در سویه والد (عدم تکثیر). (ب) واکنش PCR با پرایمرهای F۲ و R۲: ستون ۱، kb۱ DNA ladder، ستون‌های ۲ تا ۷، PCR در سویه‌های جهش‌یافته (۹۹۵bp) و ستون ۸، PCR در سویه والد (۱۲۸۳bp).

(ج) واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای خارج و داخل کاست حذف: ستون ۱، kb DNA ladder۱، ستون‌های ۲ تا ۴، تکثیر با پرایمرهای UpF و RK از سویه‌های جهش‌یافته (ستون ۲ و ۳، ۱۴۵۶bp) و از سویه والد (ستون ۴، عدم تکثیر)، و ستون‌های ۵ تا ۷، تکثیر با پرایمرهای FK۲ و DnR از سویه‌های جهش یافته (ستون ۵ و ۶، ۸۴۸bp) و از سویه والد (ستون ۷، عدم تکثیر).

کانامایسین ما بین نواحی نوکلئوتیدی همولوگ بالا دست و پائین دست ژن مورد نظر (۴۴۶ bp در طرف بالادست و ۴۶۵bp در طرف پایین دست) تعبیه شده بود (شکل ۱-ب).

ساخت وکتور خودکشی و انجام نوترکیبی همساخت

ساخت وکتور خودکشی، انجام نوترکیبی همساخت و تأیید سویه جهش یافته بر اساس روش‌های مولکولی ارائه شده در مقالات موجود صورت گرفت [۳۰-۱۸،۲۴]. وکتور خودکشی از طریق برش وکتور pBluescriptIISK(-) (Fermentas) بوسیله آنزیم EcoRV (Fermentas) و الحاق[1] قطعه کاست حذف درون وکتور برش یافته، ساخته شد و تحت عنوان pBluescriptSK-kanΔper نامگذاری شد (شکل ۲). وکتور خودکشی از طریق الکتروپوریشن[2] درون Rev۱ انتقال یافت. تهیه سلول‌های مستعد الکتروکامپتنت و انجام الکتروپوریشن طبق دستورالعمل شرکت سازنده دستگاه (Eppendorf) صورت گرفت. بدین منظور ۱۰µg از وکتور خودکشی با ۵۰µl از سلول‌های مستعد (۱×۱۰^{۶} cells/ml) مخلوط شده و داخل کووت سرد انتقال یافت. الکتروپوریشن با ولتاژ ۲۵۰۰ در دستگاه مولتی پوریتور[3] (Eppendorf) صورت گرفت. بلافاصله بعد از انجام الکتروپوریشن، ۱ml از محیط TSB درون کووت اضافه شده و پس از انتقال درون میکروتیوپ استریل بمدت ۶ ساعت در دمای ۳۷^{o}C قرار گرفت. سپس مقادیر مشخصی از محیط فوق روی پلیت‌های TSA حاوی ۳۰µg/ml کانامایسین انتقال یافته و بمدت ۶-۴ روز تحت دمای ۳۷^{o}C و فشار ۵٪ CO_2 قرار گرفت. در ادامه تعدادی از کلنی‌های رشد یافته انتخاب و DNA ژنومی آنها استخراج شد. حذف شدن ژن per از ژنوم سویه‌های جهش‌یافته بوسیله انجام واکنش‌های PCR از روی ژنوم استخراج شده بعنوان الگو و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و آنزیم Taq DNA polymerase (Fermentas)، تأیید شد. پرایمرها برای تشخیص مابین سویه‌های والد، جهش یافته اختصاصی و جهش یافته غیراختصاصی طراحی شدند (جدول ۱).

انجام واکنش RT-PCR

وجود بیان یا عدم بیان آنزیم پروزامین سنتتاز در سویه جهش یافته با انجام واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی

[1:] Ligation, [2:] Electroporation, [3:] Multiporator

مجله طب انتظامی
تابستان ۱۳۹۲ - شماره ۲ - مسلسل ۲- صفحات ۱۲۷-۱۳۸

طراحی شده از ترادف per صورت گرفت. بدین منظور، بدنبال استخراج RNA کل سلولی و حذف DNA ژنومی از آن، انجام رونوشت برداری معکوس بوسیله آنزیم RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) و با استفاده از پرایمرهای رندوم هگزامر (Fermentas) صورت گرفت. تکثیر محصول این مرحله بوسیله آنزیم Taq DNA polymerase و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده از ترادف per صورت گرفت (جدول ۱).

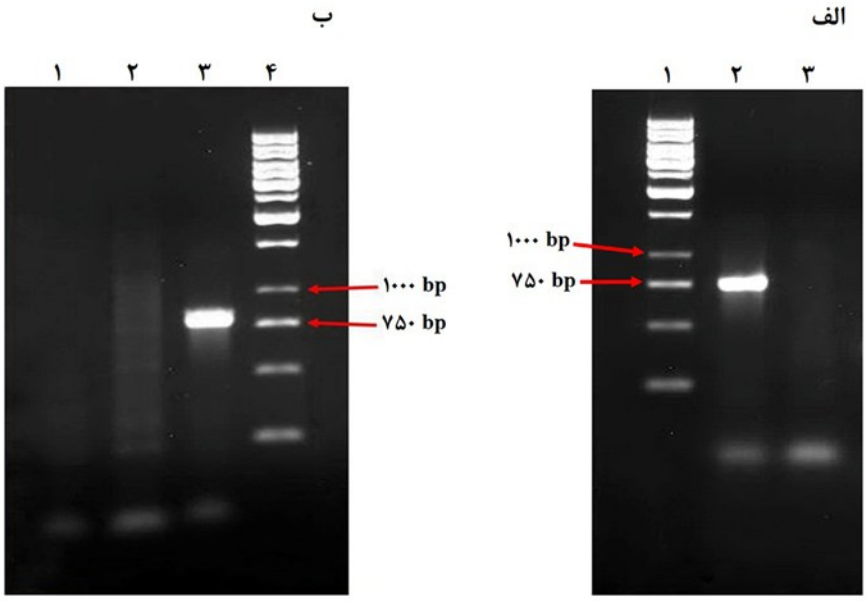
یافته‌ها

ساخت کاست حذف و وکتور خودکشی

بمنظور تکثیر ترادف کدکننده ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین و تهیه کاست حذف حامل ترادف کدکننده kan به همراه ترادف‌های طرفین ژن per در دو طرف آن (۴۴۶ bp در طرف بالادست و ۴۶۵bp در طرف پایین دست)، PCR سه مرحله‌ای صورت گرفت (شکل ۳). ابتدا همزمان دو واکنش PCR با استفاده از جفت پرایمرهای F۱ با ۳SPR و ۳SPF با R۱ بر روی DNA ژنومی باکتری بروسلا ملی تنسیس سویه Rev۱ بعنوان الگو، بصورت جداگانه صورت گرفت و قطعات مورد انتظار ۴۷۰bp (ستون‌های ۱ تا ۴) برای PCR۱ و ۴۸۷bp (ستون‌های ۶ تا ۹) برای PCR۲ حاصل شد (شکل ۳-الف). قطعات حاصل در انتهای ۳′ خود بترتیب دارای ترادف تک رشته‌ای ۲۴ و ۲۲ نوکلئوتیدی بودند که بعنوان پرایمر برای واکنش PCR سوم عمل می‌کردند. واکنش PCR سوم با استفاده از جفت پرایمر F۱ و R۱ بر روی مخلوط محصول واکنش‌های PCR۱ و PCR۲ و محصول واکنش PCR بر روی پلاسمید pET۲۸a(+) بعنوان الگو، صورت گرفت و قطعه مورد انتظار ۱۷۲۷bp (ستون‌های ۲ تا ۵) حاصل شد که همان قطعه کاست حذف بود (شکل ۳-ب). در ادامه، وکتور خودکشی از طریق برش وکتور pBluescriptIISK (-) بوسیله آنزیم EcoRV و داخل سازی قطعه کاست حذف درون وکتور برش یافته، ساخته شد و با انجام آنالیزهای آنزیمی و تعیین توالی قطعه کلون شده مورد تأیید قرار گرفت (نتایج ارائه نشده است).

بررسی حذف per در سویه‌های جهش یافته

بدنبال الکتروپوریشن وکتور خودکشی درون سلول‌های Rev۱، تعدادی از کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط حاوی کانامایسین انتخاب و DNA ژنومی آنها استخراج و به منظور تأیید انجام نوترکیبی و داخل شدن ترادف kan در قالب خوانش صحیح[1] بجای ترادف per در درون ژنوم سویه جهش یافته، واکنش‌های PCR صورت گرفت (شکل ۴). ابتدا، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی FK۱ (در موقعیت نوکلئوتیدی ۵۴۶ از روی ترادف کدکننده kan) و R۲ (در موقعیت نوکلئوتیدی ۸۴ پایین



شکل ۵: بررسی عدم عملکرد ژن per در سویه جهش یافته بوسیله RT-PCR با پرایمرهای FP و RP. (الف) واکنش PCR بر روی DNA ژنومی: ستون ۱، ۱kb DNA ladder، ستون ۲، در سویه والد (۷۷۰bp) و ستون ۳، در سویه جهش یافته (عدم تکثیر). (ب) ستون ۱، واکنش PCR بر روی RNAکل سلولی تیمار شده با DNaseI در سویه والد (عدم تکثیر)؛ ستون ۲، واکنش RT-PCR در سویه جهش یافته (عدم تکثیر)؛ ستون ۳، واکنش RT-PCR در سویه والد (۷۷۰bp)؛ و ستون ۴، ۱kb DNA ladder.

[1]: In frame

Journal of Police Medicine
Summer 2013; Vol. 2, No. 2: 127-138

دست ترادف کدکننده per) صورت گرفت (شکل ۴-الف). انتظار می‌رفت انجام PCR از روی ژنوم جهش‌یافته با این پرایمرها منجر به تکثیر قطعه bp ۳۵۴ بشود و در سویه والد تکثیر صورت نگیرد. همانطوریکه در شکل ۴-الف مشاهده می‌شود، در مورد همه کلنی‌ها قطعه bp ۳۵۴ حاصل شده است (ستون‌های ۲ تا ۷)، درحالیکه در سویه والد هیچ تکثیری صورت نگرفته است (ستون ۸). همچنین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی F۲ و R۲ (بترتیب در موقعیت نوکلئوتیدی ۹۵ بالادست و ۸۴ پایین دست ترادف کدکننده per) واکنش PCR دیگری صورت گرفت (شکل ۴-ب). انتظار می‌رفت انجام PCR با این پرایمرها در مورد سویه جهش یافته مطلوب (داخل شدن ترادف kan در قالب خوانش صحیح بجای ترادف per در درون ژنوم با انجام کراسینگ اور دو طرفه[1]) منجر به تکثیر قطعه ۹۹۵bp، در مورد سویه والد (عدم وقوع نوترکیبی) منجر به تکثیر قطعه ۱۲۸۳bp، و در مورد سویه جهش یافته غیر مطلوب (ورود وکتور نوترکیب داخل ژنوم با انجام کراسینگ اور یک طرفه[2]) منجر به تکثیر قطعات ۹۹۵bp و ۱۲۸۳bp، بشود. همانطوریکه در شکل ۴-ب مشاهده می‌شود، در مورد همه کلنی‌های انتخاب شده، قطعه ۹۹۵bp حاصل شده است (ستون‌های ۲ تا ۷)، درحالیکه در سویه والد هیچ تکثیری صورت نگرفته است (ستون ۸). در ستون شماره ۴ علاوه بر قطعه ۹۹۵bp یک قطعه ۱۲۸۳bp نیز حاصل شده است و بیانگر یک سویه جهش یافته غیر مطلوب می‌باشد. لذا همه سویه‌های جهش یافته انتخاب شده غیر از سویه شماره ۳، سویه‌های جهش یافته مطلوب بودند. در ادامه بمنظور تأیید بیشتر، با استفاده از پرایمرهای طراحی شده از روی ترادف ژنوم خارج از ترادف کاست حذف (UpF و DnR) به همراه پرایمرهای داخل ترادف کاست حذف (FK۲ و RK)، واکنش PCR از سویه والد و دو سویه جهش یافته انتخاب شده صورت گرفت (شکل ۴-ج). انتظار می‌رفت انجام PCR با پرایمرهای UpF (در موقعیت نوکلئوتیدی ۲۶۹ بالادست ترادف کاست حذف) و RK (در موقعیت نوکلئوتیدی ۷۴۱ ترادف kan) در سویه جهش یافته منجر به تکثیر قطعه ۱۴۵۶bp بشود درحالیکه در سویه والد هیچ تکثیری صورت نگیرد. همچنین انجام PCR با پرایمرهای FK۲ (در موقعیت نوکلئوتیدی ۹۵ ترادف kan) و DnR (در موقعیت نوکلئوتیدی ۲۰۱ پایین دست ترادف کاست حذف) می‌بایست در سویه جهش یافته منجر به تکثیر قطعه ۸۴۸bp می‌شد درحالیکه در سویه والد هیچ تکثیری صورت نمی‌گرفت. همانطوریکه در شکل ۴-ج مشاهده می‌شود، در هر دو سویه جهش یافته انتخاب شده، قطعات ۱۴۵۶bp (ستون‌های ۲ و ۳) و ۸۴۸bp (ستون‌های ۵ و ۶) حاصل شده است، درحالیکه در سویه والد هیچ تکثیری صورت نگرفته است (ستون‌های ۴ و ۷). در ادامه، قطعه ۱۴۵۶bp بوسیله آنزیم Pfu DNA polymerase سنتز شده و بعد از کلون در وکتور کلونینگ، قطعه کلون شده تعیین توالی گردید (نتایج ارائه نشده

نام پرایمر	سکانس پرایمر (۳′→۵′)	ترادف هدف
پرایمرهای PCR سه مرحله ای	F1	بالادست per
	CGTTTCCCGTTGAA-TATGGCTCATGTATGGATCATTCCTTAGG	بالادست kan-per
	GATGCTCGATGAGTTTTTCTAATGAGACGATTTCG-TATGATATC	پایین دست kan-per
	CAAGGATGGGTAGCAAAGTTGG	پایین دست per
پرایمرهای بررسی حذف per	CATAAGCTCTTGCCATTCTCACC	ترادف kan
	GTAAATCAGACATTGAAAGGTGC	پایین دست per
	TGAGATGATAGCAGAAGACTTAGC	بالادست per
	GTAAATCAGACATTGAAAGGTGC	پایین دست per
	TACTACCAAGCATCCACCTCTGAG	بالادست کاست حذف
	AAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAG	ترادف kan
	TAGGTTGTATTGATGTTGGACGAG	ترادف kan
	CTCTTAGAATCTGCATCACGTGG	پایین دست کاست حذف
پرایمرهای RT-PCR	CTTGATACAGGGTGGATCTCGTC GAATGTTTAAC-GTCTCCCACAGG	ترادف per
		ترادف per

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

[1]: Double crossover, [2]: Single crossover

مجله طب انتظامی
تابستان ۱۳۹۲ - شماره ۲ - مسلسل ۲- صفحات ۱۲۷-۱۳۸

است).

بررسی عدم عملکرد ژن per

بدنبال تأیید وجود یا عدم وجود ترادف کدکننده per در ژنوم سویه جهش یافته با انجام واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی FP و RP (بترتیب در موقعیت نوکلئوتیدی ۶۴ و ۸۱۰ ترادف کد کننده per)، تأیید وجود بیان یا عدم بیان آنزیم پروزامین سنتتاز در سویه جهش یافته نیز با انجام واکنش RT-PCR با همان پرایمرها صورت گرفت (شکل ۵). انتظار می‌رفت انجام PCR با این پرایمرها از روی ژنوم در سویه والد منجر به تکثیر قطعه ۷۷۰bp بشود و در سویه جهش یافته هیچ تکثیری صورت نگیرد. همانطوریکه در شکل ۵-الف مشاهده می‌شود با انجام PCR در سویه والد قطعه ۷۷۰bp حاصل شده است (ستون ۲)، درحالیکه در سویه والد هیچ تکثیری صورت نگرفته است (ستون ۳). واکنش RT-PCR از روی RNA کل سلولی تیمار شده با DNaseI صورت گرفت. انتظار می‌رفت انجام PCR از روی محصول RT در سویه والد منجر به تکثیر قطعه ۷۷۰bp بشود و در سویه جهش یافته هیچ تکثیری صورت نگیرد. همانطوریکه در شکل ۵-ب مشاهده می‌شود با انجام PCR در سویه والد قطعه ۷۷۰bp حاصل شده است (ستون ۳)، درحالیکه در سویه جهش یافته هیچ تکثیری صورت نگرفته است (ستون ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

بروسلوز یک بیماری ناتوان کننده مشترک بین انسان و حیوان است و هنوز بعنوان مشکل اصلی در برخی مناطق جهان مطرح است. آن همچنین بعنوان یک عامل تأثیر گذار در شرایط اقتصادی و تجارت و صادرات یک کشور محسوب می‌شود. بنابراین کنترل این باکتری یک هدف بهداشتی مهم در کشورهای درگیر بیماری می‌باشد. امروزه موافقت شده است که واکسیناسیون بر علیه این باکتری، مهمترین روش کنترل این بیماری می‌باشد. مطالعات مختلف نشان داده است که واکسن S۱۹ در گوساله‌ها و واکسن Rev۱ در گوسفند و بز مؤثر می‌باشد. در کنار تأثیر مثبت، هر دو واکسن خصوصیات نامطلوبی نیز دارند، چرا که این واکسن‌ها برای انسان خطرناک هستند، و در حیوانات باردار نیز منجر به سقط جنین می‌شوند. این واکسن‌ها همچنین پس از تزریق به حیوانات ایجاد پاسخ ایمنی می‌کنند که تمایز آن از واکنش ناشی از بیماری غیرممکن می‌باشد [۲۲ و ۱۷]. این مسئله می‌تواند مشکل ساز باشد چرا که تست‌های سرولوژیک موجود، مشخص نمی‌کند که آیا حیوانی که در معرض واکسن قرار گرفته، آلوده بوده است یا اینکه در بدنش آنتی‌بادی ضد واکسن تولید شده است. از طرف دیگر، باکتری بروسلا می‌تواند بعنوان یک عامل بیولوژیک توسط دشمنان در تهاجم نظامی نیز مورد استفاده قرار بگیرد. با توجه به این موضوع و با توجه به وضعیت کنونی منطقه که کشور ما در معرض تهدید از جانب بد خواهان قرار دارد، تولید واکسن‌های جدید و مؤثرتر بویژه واکسن‌های زنده جهش یافته که فاقد مشکلات مطرح شده در مورد واکسن‌های موجود باشند، علیه باکتری بروسلا ضروری می‌باشد. جایگزین سازی و ناک اوت ژنی بوسیله نوترکیبی همساخت در بروسلا بعنوان یک روش مهم برای ایجاد جهش‌های اختصاصی ژنی در مطالعات مختلفی ارائه شده است [۳۵-۲۵]. در این مطالعات، تخریب ژن هدف از طریق راهکار حذف[1] و یا اینسرت کردن[2] صورت گرفته است. هر دوی این راهکارها منجر به از دست رفتن عملکرد ژن هدف گردیده است. همانطوریکه هالینگ و همکارانش شرح داده اند، پلاسمیدهای مشتق از ColE1 که دارای طیف میزبانی پایینی هستند، قادر به تکثیر در سویه‌های مختلف بروسلا نبوده و می‌توانند زمانیکه حامل ترادف DNA بروسلا هستند، بعنوان وکتور خودکشی عمل بکنند [۳۰]. از بین وکتورهای فوق، وکتورهای بر پایه pMB1 از قبیل pBluescriptII، pUC۱۸ ، pUC۱۹ و pUC4k در طی مطالعاتی برای جایگزین‌سازی ژنی در بروسلا مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۳۵-۳۲]. در مطالعه‌ای که توسط Godforid و همکارانش انجام شده، نقش ژن‌های مورد نیاز جهت سنتز آنتی ژن O از باکتری بروسلا ملی تنیسس سویه ۱۶M مشخص شده است و مهمترین ژن بررسی شده ژن per می‌باشد [۱۸]. جهت بررسی عملکرد ژن per، آنها ابتدا با استفاده از ترانسپوزون[3] Tn5 سویه‌های جهش یافته‌ای از باکتری بروسلاملی‌تنسیس ایجاد کردند. سپس قطعات حامل ترادف‌های با قالب خوانش باز[4] (ORF) را کلون و توالی‌یابی کرده و گونه بدست آمده را جهت بررسی نقش S-LPS در عفونت‌های بروسلایی مورد استفاده قرار دادند. در مطالعه حاضر، ما از وکتور pBluescriptIISK(-) برای انجام نوترکیبی همساخت و حذف ژن per در بروسلا استفاده کردیم. ما از ترادف کدکننده ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین به عنوان ابزار حذف و مارکر مثبت استفاده نمودیم. ترادف kan^R مورد استفاده فاقد سکانس پروموتری بود، لذا بعد از الحاق آن در قالب خوانش صحیح بداخل ژنوم بروسلا، آن برای بیان تحت کنترل پروموتر زنجیره O از LPS باکتری قرار می‌گرفت. مقاومت سویه جهش یافته حاصل به kan اولین مدرک برای تأیید صحت وقوع نوترکیبی و جایگزین شدن ترادف kan^R در قالب خوانش صحیح بجای per در ژنوم بروسلا بود. برای اطمینان از عدم دخول وکتور درون ژنوم بروسلا سویه‌های جهش یافته انتخاب شده در محیط حاوی آمپی‌سیلین

[1]: Deletion, [2]: Insertion, [3]: Transposon, [4]: Open Reading Frame

Journal of Police Medicine
Summer 2013; Vol. 2, No. 2: 127-138

کشت داده شد که تنها یک سویه (سویه شماره ۳، شکل ۴-ب) در این محیط رشد یافت و این سویه یک سویه جهش یافته نامطلوب بود. وجود این سویه با بررسی مولکولی از طریق انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی نیز مورد تأیید قرار گرفت. ما همچنین صحت وقوع نوترکیبی و جایگزین شدن ترادف kan^R در قالب خوانش صحیح بجای per در ژنوم بروسلا را با انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی و نهایتاً تعیین توالی قطعه تکثیر یافته مورد تأیید قرار دادیم. ما با انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی و همچنین با مقایسه محصول واکنش‌های RT-PCR انجام یافته با پرایمرهای اختصاصی از سویه‌های والد و جهش یافته، حذف کامل ژن per از ژنوم بروسلا و عدم بیان آنزیم پروزامین سنتتاز در سویه جهش‌یافته را مورد بررسی قرار دادیم. بدین ترتیب نتایج حاصل، صحت انجام نوترکیبی همساخت و تولید سویه جهش یافته Rev۱ فاقد فعالیت پروزامین سنتتازی را مورد تأیید قرار داد. سویه حاصل یک سویه جهش یافته دارای نقص در ساختار LPS خود بوده و در نتیجه علاوه بر کاهش خطا در تمایز ما بین حیوان واکسینه شده و حیوان آلوده در تست‌های تشخیصی، می‌تواند علاوه بر انجام تست‌های تکمیلی از قبیل سنجش بیوشیمیایی آنزیم پروزامین سنتتاز و وسترن بلات، با حذف ترادف مقاومت به کانامایسین و با انجام آزمون‌های ایمنولوژیکی بعنوان یک سویه کاندید واکسن مورد بررسی قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به خاطر حمایت مالی این تحقیق تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

1. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N. Brucella: A pathogen without classic virulence genes. Vet Microbiol 2008; 129: 1–14.
2. Roop RM, Bellaire BH, Wright Valderas M, Cardelli JA. Adaptation of the brucellae to their intracellular niche. Mol Microbiol 2004; 52: 621–30.
3. Fernandez-Prada CM, Zelazowska EB, Nikolich M, Hadfield TL, Roop RM, Robertson GL, et al. Interactions between Brucella melitensis and human phagocytes: bacterial surface O-Polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. Infect Immun 2003; 71: 2110-19.
4. Gorvel JP, Moreno E. Brucella intracellular life: From invasion to intracellular replication. Vet Microbiol 2002; 90: 281–97.
5. Celli J. Surviving inside a macrophage: The many ways of Brucella. Res Microbiol 2006; 157: 93–8.
6. Kohler S, Foulongne V, Ouahrani-Bettache S, Bourg G, Teyssier J, Ramuz M, et al. The analysis of the intramacrophagic virulome of Brucella suis deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 15711–16.
7. Pizarro-Cerda J, Meresse S, Parton RG, van der Goot G, Sola-Landa A, Lopez-Goni I, et al. Brucella abortus transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. Infect Immun 1998; 66: 5711–24.
8. Celli J, Gorvel JP. Organelle robbery: Brucella interactions with the endoplasmic reticulum. Curr Opin Microbiol 2004; 7: 93–7.
9. Delrue RM, Martinez-Lorenzo M, Lestrate P, Danese I, Bielarz V, Mertens P, et al. Identification of Brucella spp. genes involved in intracellular trafficking. Cell Microbiol 2001; 3: 487-97.
10. Hong PC, Tsolis RM, Ficht TA. Identification of genes required for chronic persistence of Brucella abortus in mice. Infect Immun 2000; 68: 4102-7.
11. Zygmunt MS, Hagius SD, Walker JV, Elzer PH. Identification of Brucella melitensis 16M genes required for bacterial survival in the caprine host. Microbes Infect 2006; 8: 2849-54.
12. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP. Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor. Curr Opin Microbiol 2005; 8: 60-6.
13. Tumurkhuu G, Koide N, Takahashi K, Hassan F, Islam S, Ito H, et al. Characterization of biological activities of Brucella melitensis lipopolysaccharide. Microbiol Immunol 2006; 50: 421-7.
14. Porte F, Naroeni A, Ouahrani-Bettache S, Liautard JP. Role of the Brucella suis lipopolysaccharide O antigen in phagosomal genesis and in inhibition of phagosome–lysosome fusion in murine macrophages. Infect Immun 2003; 71: 1481–90.
15. Martinez de Tejada G, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Moriyon I. The outer membranes of Brucella spp. are resistant to bactericidal cationic peptides. Infect Immun 1995; 63: 3054-61.
16. Rasool O, Freer E, Moreno E, Jarstrand C. Effect of Brucella abortus lipopolysaccharide on

oxidative metabolism and lysozyme release by human neutrophils. Infect Immun 1992; 60: 1699-702.
17. Moriyón I, Grilló MJ, Monreal D, González D, Marín C, López-goñib I, et al. Rough vaccines in animal brucellosis: Structural and genetic basis and present status. Vet Res 2004; 35: 1–38.
18. Godfroid F, Taminiau B, Danese I, Denoel P, Tibor A, Weynants V, et al. Identification of the Perosamine Synthetase Gene of Brucella melitensis 16M and Involvement of Lipopolysaccharide O Side Chain in Brucella Survival in Mice and in Macrophages. Infect Immun 1998; 66: 5485–93.
19. Allen CA, Adams LG, Ficht TA. Transposon-derived Brucella abortus rough mutants are attenuated and exhibit reduced intracellular survival. Infect Immun 1998; 66: 1008-16.
20. Jimenez De Bagues MP, Terraza A, Gross A, Dornand J. Different responses of macrophages to smooth and rough Brucella spp.: relationship to virulence. Infect Immun 2004; 72: 2429-33.
21. Pei J, Turse JE, Wu Q, Ficht TA. Brucella abortus rough mutants induce macrophage oncosis that requires bacterial protein synthesis and direct interaction with the macrophage. Infect Immun 2006; 74: 2667–75.
22. Gonzalez D, Grillo MJ, De Miguel MJ, Ali T, Arce-Gorvel V, Delrue RM, et al. Brucellosis Vaccines: Assessment of Brucella melitensis Lipopolysaccharide Rough Mutants Defective in Core and O-Polysaccharide Synthesis and Export. PLOS ONE 2008; 3: e2760.
23. Ghigo J-M. Lambda red-mediated Gene manipulation in Gram-negative bacteria: bacteria: the 3-step PCR (3S-PCR) Protocol. 2004. Genetics of Biofilms Laboratory, available at: http://www.pasteur.fr/recherche/unites/Ggb/images/0-matmet/1-PCR-3S.presentation.pdf.
24. Fahimi H, Sadeghizadeh M, Heidari S, Mohammadipoor M. Recombinant Expression of Domain III of Dengue Virus Envelope Poretein (Serotype-1). J Police Med 2012; 1: 54-61. (Persian)
25. Fernandez-Prada CM, Nikolich M, Vemulapalli R, Sriranganathan N, Boyle SM, Schurig GG, et al. Deletion of wboA enhances activation of the lectin pathway of complement in Brucella abortus and Brucella melitensis. Infect Immun 2001; 69: 4407-16.
26. Tatum FM, Detilleux PG, Sacks JM, Halling SM. Construction of cu-zn superoxide dismutase deletion mutants of Brucella abortus: analysis of survival in vitro in epithelial and phagocytic cells and in vivo in mice. Infect Immun 1992; 60: 2863-9.
27. Elzer PH, Phillips RW, Kovach ME, Peterson KM, Roop MR. Characterization and genetic complementation of a Brucella abortus hightemperature requirement A (htrA) deletion mutant. Infect Immun 1994; 62: 4135-9.
28. Drazek ES, Houng HS, Crawford RM, Hadfield TL, Hover DL, Warren RL. Deletion of purE attenuates Brucella melitensis 16M for growth in human monocyte-derived macrophages. Infect Immun 1995; 63: 3297-301.
29. Tibor A, Jacques I, Guilloteau L, Verger JM, Grayon M, Wansard V, et al. Effect of P39 Gene Deletion in Live Brucella Vaccine Strains on Residual Virulence and Protective Activity in Mice. Infect Immun 1998; 66: 5561–4.
30. Halling SM, Detilleux PG, Tatum FM, Judge BA, Mayfield JE. Deletion of the BCSP31 gene of Brucella abortus by replacement. Infect Immun 1991; 59: 3863-8.
31. Crawford RM, van de verg L, Yuan L, Hadfield TL, Warren RL, Drazek ES, et al. Deletion of purE Attenuates Brucella melitensis Infection in Mice. Infec Immun 1996; 64: 2188–92.
32. Sola-Landa A, Pizarro-Cerda J, Grillo MJ, Moreno E, Moriyon I, Blasco JM, et al. A two -component regulatory system playing a critical role in plant pathogens and endosymbionts is present in Brucella abortus and controls cell invasion and virulence. Mol Microbiol 1998; 29: 125-38.
33. Ugalde JE, Czibener C, Feldman MF, Ugalde RA. Identification and characterization of the Brucella abortus phosphoglucomutase gene: role of lipopolysaccharide in virulence and intracellular multiplication. Infect Immun 2000; 68: 5716-23.
34. Alvarez-Martinez MT, Machold J, Weise C, Schmidt-Eisenlorh H, Baron C, Rouot B. The Brucella suis homologue of the Agrobacterium tumefaciens chromosomal virulence operon chvE is essential for sugar utilization but not for survival in macrophages. J Bacteriol 2001; 183: 5343-51.

Journal of Police Medicine

Summer 2013; Vol. 2, No. 2: 127-138

35. Kohler S, Ouahrani-Bettache S, Layssac M, Teyssier JT, Liautard JP. Constitutive and inducible expression of green florescent protein in Brucella suis. Infect Immun 1999; 67: 6695-7.

مجله طب انتظامی
تابستان ۱۳۹۲ - شماره ۲ - مسلسل ۲- صفحات ۱۲۷-۱۳۸