مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره 22، شماره 3، پاییز 91، صفحات 184 تا 190

Original Article

همسانه سازی ژن *virG* و ساخت سازه جهش یافته pGEMΔ*virG* به منظور القای نوترکیبی در سویه *شیگلا دیسانتری* بومی

حورا احمدی دانش[1]، مجتبی سعادتی[2]، محمد دورودیان[3]، باقر یخچالی[4]، علی اصغر کارخانه[5]، سید مصطفی حسینی[6]، مختار زارع[7]، مهرداد هاشمی[8]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی سلولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)
[2] دانشیار، دکترای باکتری شناسی، گروه زیست شناسی سلولی، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین (ع)
[3] دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، باشگاه پژوهشگران جوان
[4] دانشیار، دکترای میکروبیولوژی، گروه صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
[5] استادیار، دکترای ژنتیک مولکولی، گروه صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
[6] باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، ، واحد علوم تحقیقات
[7] پژوهشگر، گروه زیست شناسی سلولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جامع امام حسین (ع)
[8] استادیار، دکترای ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *بیماری شیگلوز از علل عمده ابتلا کودکان به اسهال در ایران است و ژن virG نقش کلیدی را در بیماری‌زایی و قدرت تهاجم باکتری شیگلا بازی می‌کند. هدف از این مطالعه، همسانه سازی، توالی یابی ژن virG و ساخت سازه جهش یافته pGEMΔvirG به منظور القای نوترکیبی در سویه شیگلا بومی با هدف ساخت سویه کاندید واکسنی زنده تقلیل حدت یافته است.*

روش بررسی: *با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی، سویه شیگلای بومی بررسی و ژن virG در حامل pGEM-7zf همسانه‌سازی و سپس توالی نوکلئوتیدی آن تعیین گردید. بر اساس اطلاعات حاصل از توالی یابی، نقشه برش آنزیمی حامل نوترکیب pGEMvirG استخراج و نسبت به حذف نواحی از ژن virG با استفاده از واکنش هضم آنزیمی اقدام شد. در نهایت، سازه pGEMΔvirG با به کار گیری روش شیمیایی به باکتری اشرشیاکلی تراریخت سازی گردید.*

یافته‌ها: *سویه شیگلای بومی تایید گردید. توالی‌یابی ژن virG در پایگاه داده‌های ژنومی (NCBI) ثبت گردید. سازه pGEMΔvirG یک ساختار جهش یافته از ژن virG در باکتری اشریشیاکلی را شامل می‌شود که 1751جفت باز از آن، از طریق واکنش هضم آنزیمی حذف شده است.*

نتیجه‌گیری: *استفاده از تکنیک تبادل آللی بر پایه بهره گیری از رخداد نوترکیبی در باکتری ها یکی از موثرترین روش های ایجاد گسستگی در ژن های هدف می باشد. این ساختار جهش یافته می تواند به منظور ایجاد سویه کاندید واکسنی زنده تقلیل حدت یافته شیگلا دیسانتری مورد استفاده قرار گیرد.*

واژگان کلیدی: *تبادل آللی ، شیگلا دیسانتری، ژن virG، کاندید واکسنی زنده تقلیل حدت یافته.*

مقدمه

باکتری شیگلا، باسیل گرم منفی روده‌ای و عامل مسری‌ترین اسهال باسیلی (دیسانتری) می‌باشد. بیماری که توسط باسیل شیگلا ایجاد می‌گردد، شیگلوز نام دارد. جنس شیگلا شامل چهار گونه دیسانتری، فلکسنری، سونه‌ای و بویدی می‌باشد (1، 2). شیگلوز با تظاهراتی شامل اسهال آبکی به همراه مقادیر مختلفی از مخاط و خون، درد، دل پیچه، تب، تهوع، سردرد و گرفتگی عضلات دیده می‌شود. شیگلا یک باکتری گرم منفی و از نظر ژنتیکی بسیار شبیه اشریشیاکلی است که گاهی از آن به عنوان اشریشیاکلی بیماری‌زا یاد می‌شود (3).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه امام حسین (ع)، مجتبی سعادتی
(**email**: m_saadati@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: 90/3/7
تاریخ پذیرش مقاله: 90/7/10

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-23]

عفونت شیگلا بیشتر از طریق آب و غذای آلوده منتقل می‌شود. البته گزارش‌هایی نیز در مورد انتقال با حشرات وجود دارد. کودکان زیر 5 سال و افرادی که به مناطق آلوده سفر می‌کنند بیشتر در معرض خطر هستند. تقریبا 10 تا 100 عدد باکتری برای ایجاد بیماری کافی است (4). در بزرگسالان بیماری معمولا بهبود می‌یابد ولی در کودکان و خردسالان بیماری شدید ایجاد می‌شود که نیاز به بستری در بیمارستان و حتی در مناطق در حال توسعه منجر به مرگ و میر می‌شود (5). تقریبا 99 درصد عفونت‌های شیگلا در مناطق در حال توسعه رخ می‌دهد و سالانه حدود 1/1 میلیون نفر از عفونت شیگلا می‌میرند که 60% آنها کودکان زیر 5 سال هستند (6). درمان با آنتی‌بیوتیک اصلی‌ترین راه درمان شیگلوز است، اما مقاومت روزافزون نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و از طرف دیگر نرخ بالای عفونت و مرگ ومیر در کودکان و همچنین قابلیت استفاده از این باکتری در بیوتروریسم ضرورت ساخت یک واکسن مؤثر بر ضد گونه‌های مختلف شیگلا را ایجاب می‌کند (7).

شیگلا ناحیه راست روده و کلون را در دستگاه گوارش هدف قرار می‌دهد، در آنجا باکتری وارد سلول‌های تخصص یافته M مستقر در فولیکول های مرتبط با سلول های پوششی روده می‌شود. باکتری سپس از طریق اندرکنش‌هایی بین پروتئین‌های باکتری و برخی مولکول‌های پیام رسان میزبان به سلول‌های پوششی روده‌ای مجاور حمله می‌کند (8، 9). هر باکتری در نهایت درون یک واکوئل اندوسیتوزی بلعیده می‌شود و پاره شدن واکوئل باعث رها شدن باکتری درون سیتوپلاسم سلول پوششی می‌شود و در آنجا تکثیر می‌شود و به کمک پروتئین حرکت درون سلولی A (IcsA)، که به نام VirG نیز شناخته می‌شود، به سمت سلول‌های پوششی مجاور حرکت می‌کند (12-10).

پروتئین VirG که یک پروتئین حیاتی برای بیماری‌زایی باکتری است، متعلق به خانواده اتوترانسپورترهای نوع 4 است. درون سلول میزبان VirG با پروتئین سندروم عصبی ویسکوت الدریچ (N-WASP) میزبانی وارد واکنش می‌شود. این پروتئین یک پروتئین تنظیم کننده اکتین سلولی است و به نوبه خود کمپلکس Arp2/3 میزبان را آزاد می‌کند و موجب پلیمریزه شدن اکتین‌های گلوبولی میزبان به شکل اکتین رشته‌ای می‌شود. تجمع اکتین رشته‌ای به صورت "دنباله‌هایی" در یک قطب سلول موجب حرکت مبتنی بر اکتین باکتری (ABM) می‌شود (7، 13، 14).

گسترش درون سلولی و بین سلولی مبتنی بر VirG باکتری به شدت باعث از دست رفتن سلامت سلولی و به وجود آمدن آسیب بافتی می‌شود. سلول‌های شیگلا که دارای نقص در ژن *virG*(*icsA*) هستند در تمام مدل‌های حیوانی قدرت بیماری‌زایی کمتری دارند (13)، و جریان لوکوسیت‌های پلی مورفونوکلئار در نهایت باکتری‌ها را می‌کشد و عفونت از بین می‌رود. بنابراین جهش در ژن *virG* (*icsA*) محور اصلی کاهش بیماری‌زایی در چندین سویه واکسن تقلیل حدت یافته است (6).

ساساکاوا و همکاران در سال 1986 با وارد کردن ترانسپوزون Tn-5 در پلاسمید تهاجمی 140 مگادالتونی باکتری شیگلا توانستند در قدرت تهاجم باکتری تداخل ایجاد کنند. آنها نشان دادند که ناحیه ژنی *virG* به طول تقریبی 4 کیلوباز، به منظور ایجاد پاسخ مثبت در تست ارزیابی قدرت تهاجمی (Sereny) ضروری می‌باشد (15). در مطالعات لت و همکاران نشان داده شد که محصول ژن *virG* در سطح خارجی غشا باکتری بیان شده و ناحیه ژنی قابل ترجمه (ORF) آن، پروتئینی به طول 1102 آمینواسید رمزگذاری می‌کند (11).

آزمایشات بالینی انجام گرفته بر روی سویه‌های متنوع واکسنی تخفیف حدت یافته نشان داده‌اند که تولید این نسل‌های واکسنی توانایی عرضه بالاترین میزان آنتی‌ژن را به سیستم ایمنی موکوزال (مخاطی) را دارا هستند و در عین حال بالاترین میزان برانگیختگی را در سیستم ایمنی بدن سبب خواهند گردید. امروزه سویه های واکسنی تهاجمی عموماً به وسیله تخفیف حدت از طریق جهش‌زایی در ژن‌های بیماری‌زایی که پس از ورود باکتری به سلول‌های بدن برای بیماری‌زایی باکتری ضروری می‌باشند انجام می‌گیرد (16).

کاتلاف و همکاران سویه واکسنی CVD1207 را از طریق ایجاد جهش اختصاصی در ژن‌های *virG*، *sen*، *set* و *guaBA* تولید نمودند. مطالعات بالینی انجام شده بر روی این سویه واکسنی نشان داد که به دلیل تخفیف حدت بالای این سویه واکسنی، از تحمل پذیری مناسبی در برابر واکنش مجدد (reactogenic) با سویه وحشی (پیش از انجام حذف ژن) در مقایسه با سویه‌های واکسنی که پیش از آن علیه شیگلا ساخته شده بود برخوردار است (17). جهش‌زایی در ژن‌های بیماری‌زا شیگلا مانند *virG*، *ipaB* و غیره یا طیفی از ژن‌های متابولیسمی مانند ژن‌های مسیر بیوسنتزی پورین‌ها ودر نهایت، ژن‌های توکسیک مانند شیگا توکسین این پتانسیل را دارا هستند که واکسن‌های ایمن و تا 100 درصد محافظ در برابر شیگلوز ایجاد نمایند (7، 14، 18). تا کنون چندین سویه واکسنی بر پایه حذف ژن *virG* از گونه‌های مختلف شیگلا ساخته شده است که می‌توان به سویه‌های واکسنی SC602 (*شیگلا فلکسنری*)، WRSS1 (*شیگلا سونه‌ای*) و WRSd1 (*شیگلا دیسانتری* تیپ 1) اشاره کرد (5، 8، 13، 19، 20).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-23]

هدف این مطالعه، طراحی و ساخت یک ساختار جهش یافته از ژن *virG* در یک سویه شیگلای بومی است که بتوان از آن در برنامه‌های توسعه واکسن علیه شیگلوز بر مبنای سویه بومی از آن استفاده نمود. به این منظور ژن *virG* از سویه شیگلایی که قبلاً در بیمارستان بقیه الله (عج) از یک بیمار ایرانی جدا شده بود، استفاده شد.

مواد و روشها

تهیه کشت خالص از نمونه: در ابتدا باکتری شیگلا از بیماران مبتلا به اسهال خونی در بیمارستان بقیه الله (عج) جدا شد. به منظور تایید نمونه تهیه شده، سویه‌های مورد نظر در محیط سالمونلا – شیگلا آگار، در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت و به مدت 16 ساعت انکوبه شدند. پس از ارزیابی‌های اولیه ریخت‌شناسی (Morphological) بر روی محیط فوق، آزمون‌های بیوشیمیایی شامل اورنیتین دکربوکسیلاز، هکتوئن، زایلوز لایزین دکربوکسیلاز، مک کانکی، TSI، ONPG، آزمون تخمیر قند آرابینوز و تولید اندول انجام شد و پس از کشت در محیط LB مایع و افزودن گلیسرول (غلظت نهایی20%) در دمای 80- درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

تکثیر ژن *virG*: به منظور شناسایی ژن *virG* از سویه شیگلا جدا شده یک جفت آغازگر اختصاصی برای تشخیص حضور این ژن با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژنی (شماره دسترسیCP000035) با استفاده از نرم افزار Gene Runner طراحی و سپس سنتز گردید (سینا کلون، ایران). توالی آغازگرهای بالادست و پایین دست تشخیص ژن *virG* در جدول 1 آمده است.

جدول 1- توالی آغازگرهای شناسایی به کارگرفته شده به منظور تکثیر ژن *virG*.

نام آغازگر	توالی آغازگر از ً5 به ً 3
vrgF	5' CGGAGAATTACCTACGGTAAAGG 3'
vrgR	5' CACCCAAAATACCTTGGGTGTC 3'

آماده سازی DNA باکتری و واکنش PCR: کلیه روش‌های مولکولی مطابق دستورالعمل هارتمن و همکاران انجام شد (26). برای تکثیر ژن *virG* یک کلنی از کشت تازه باکتری در 50 میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل مخلوط و حدود 15 دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شد. 5 میکرولیتر از این مخلوط به عنوان DNA الگو به همراه 10 پیکو مول از هر کدام از آغازگرها، 5 میکرولیتر بافر PCR 10X (شرکت fermentase)، 400 ماکرو مولار از dNTPs 2 واحد آنزیم *pfu* (fermentase) و ddH_2O تا حجم 50 میکرولیتر اضافه شد و در دستگاه ترموسایکلر TECHNE Flexigene قرار داده شد. واکنش PCR طبق برنامه 94 درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، 50 درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، 72 درجه سانتی‌گراد 7 دقیقه در 30 چرخه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز 1% الکتروفورز و بررسی گردید. DNA تکثیر شده با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR (شرکت Roche) خالص و جهت شناسایی تعیین توالی گردید.

همسان‌سازی ژن *virG* در پلاسمید ناقل T: محصول PCR ژن *virG* با استفاده از ناقل پلاسمیدی pGEM-7zf خطی شده با آنزیم *Sma*I به کمک کیت PCR product cloning (Fermentas) انجام گردید و سپس به سویه اشرشیا کلی (سویه DH5α) منتقل و کلونی‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (غلظت 100 میکروگرم در میلی لیتر) بر روی محیط LB پس از گذشت 16 ساعت غربالگری شد.

واکنش هضم آنزیمی: ناقل پلاسمیدی pGEM-7zf فاقد جایگاه برش آنزمی برای آنزم محدود کننده *Hinc*II می باشد. پس از همسانه سازی ژن *virG* در حامل pGEM-7zf، نقشه برش آنزیمی پلاسمید pGEM*virG* با استفاده از نرم افزار تحت شبکه webcutter و نیز نرم افزار DNASIS استخراج گردید. ژن *virG* دارای سه جایگاه برش برای آنزیم *Hinc*II می باشد و بنابراین، در اثر برش آنزیمی حامل pGEM*virG* با استفاده از آنزیم محدودد کننده *Hinc*II سه قطعه 705، 1046 و 4473 جفت بازی ایجاد خواهد شد. با توجه به اطلاعات فوق، پلاسمید pGEM*virG* تحت برش آنزیمی با آنزیم *Hinc*II قرار گرفت و در اثر برش آنزیمی 1751 جفت باز از ژن *virG* حذف گردید. قطعه 4473 جفت بازی از پلاسمید pGEM*virG* و 1476 جفت باز از ژن *virG* تشکیل شده با استفاده از کیت استخراج DNA از روی ژل شرکت Roche خالص‌سازی گردید. سپس برای قطعه باقیمانده بر روی پلاسمید pGEM*virG* واکنش خود اتصالی (self ligation) گذاشته شد و ساختار جهش یافته pGEMΔ*virG* حاصل گردید.

تایید حذف بخشی از ژن *virG* با استفاده از واکنش PCR: برای تایید وجود ژن *virG* دارای حذف از نمونه‌های واجد pGEMΔ*virG* با آغازگرهای vrgF و vrgR واکنش PCR

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-23]

انجام و اندازه قطعه حاصل با اندازه ژن *virG* در سویه طبیعی مقایسه و ارزیابی گردید. در نهایت، با هدف القای نوترکیبی بین پلاسمید pGEMΔ*virG* و ژن *virG* در سویه جدا شده از بیمار، پلاسمید ساخته شده با سویه اشرشیا کلی (سویه DH5α) به منظور تثبیت ساختار ساخته شده تراریخت سازی گردید.

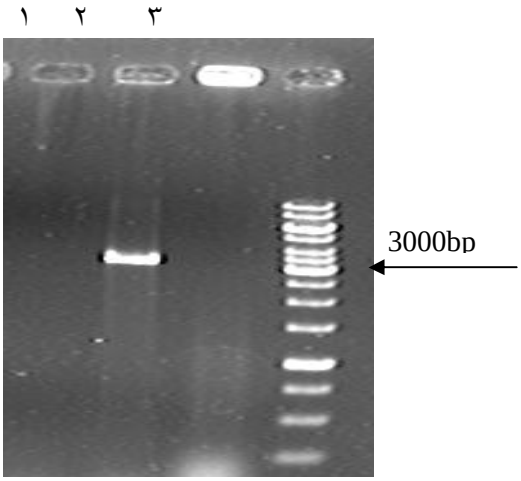
تحلیل بیوانفورماتیکی ساختار سوم پروتئین VirG :

به منظور ارزیابی ساختار سوم پروتئین VirG در حالت طبیعی و مقایسه آن با فرم جهش یافته از نرم افزارهای تحت شبکه Esy Pred3D Web server Status و پیشگویی ساختار آن با استفاده از نرم افزار VMD1.4.7 که در دانشگاه ایلینویز (ایالات متحده آمریکا) طراحی گردیده است، استفاده شد.

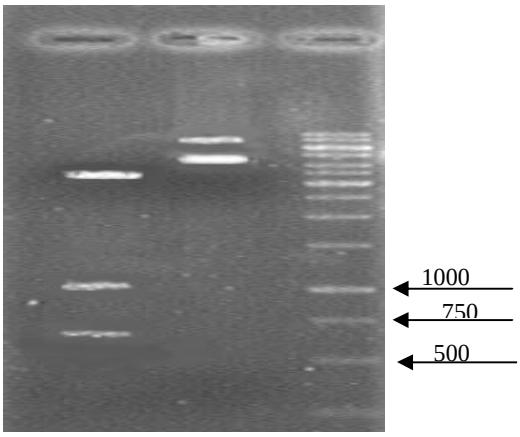
یافته‌ها

بر اساس اطلاعات موجود در پایگاه داده های ژنومی (NCBI)، اندازه ژن *virG*، 3309 جفت باز می باشد. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای vrgF و vrgR مطابق مراحل ارائه شده در بالا انجام گردید. با توجه به محدودیت‌های ساختاری توالی این ژن (از نظر وجود نواحی تکراری غنی از A/T) آغازگرها به نحوی طراحی گردیدند که قادر به تکثیر 3227 جفت باز (نوکلئوتید شماره 57 تا 3293) از ژن *virG* بودند. محصول این PCR روی ژل آگارز 1/5 درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید (25 میکروگرم در میلی لیتر) ارزیابی شد. شکل 1 تصویر محصول واکنش PCR در کنار نشانگر مولکولی DNA را نشان می دهد.

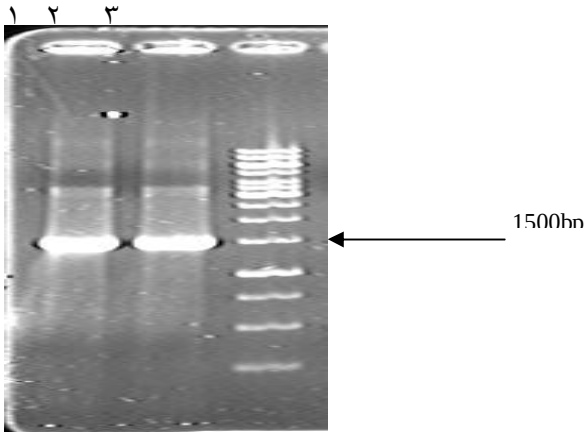
مراحل ثبت توالی نوکلئوتیدی ژن *virG* بومی (ایران) در پایگاه داده های ژنومی NCBI در حال انجام است. نقشه جایگاه های آنزیمی پلاسمید pGEM*virG* نشان داد، این پلاسمید دارای سه جایگاه برش برای آنزیم *Hinc*II می باشد. واکنش هضم آنزیمی یگانه با استفاده از آنزیم *Hinc*II انجام شد. همانطور که در شکل 2 مشاهده می‌گردد، صحت فرآیند فوق با حضور قطعات 705، 1046 و 4473 جفت بازی بر روی ژل آگاروز (1/5 درصد) تایید گردید. پس از انجام خالص سازی قطعه 4473 جفت بازی و انجام واکنش خود الحاقی ساختار جهش یافته pGEMΔ*virG* به دست آمد که در آن 1751 جفت باز از ژن *virG* دچار حذف گردیده است.



شکل 1- تکثیر ژن *virG* توسط PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی vrgF و vrgR. 1- نمونه جدا شده از بیمار ایرانی، در حدود 3200 باند دارد، 2- نمونه *E. coli* به عنوان کنترل منفی، 3- مارکر وزن مولکولیDNA



شکل 2- برش آنزیمی pGEMvrg باآنزیم HincII. ستون 1- pGEMvrg برش خورده با HincII، ستون 2- pGEMvrg برش نخورده، ستون 3- مارکر وزن مولکولیDNA

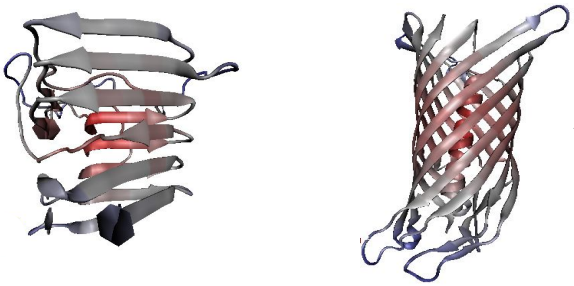


شکل 3- بررسی کلنی‌های حاوی pGEMΔvrg توسط PCR. 1 و 2- محصول PCR کلون‌های واجد pGEMΔvrg با استفاده از پرایمرهای vrgF و vrgR، 3- مارکر وزن مولکولیDNA

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-23]

همانطور که در شکل 3 مشاهده می نمایید، محصول PCR سویه‌های غربالگری شده دارای پلاسمید pGEMΔ*virG* با استفاده از آغازگرهای vrgF و vrgR نشان داده شده است. حضور باند 1476 جفت بازی نمایانگر حذف 1751 جفت باز از ژن *virG* می‌باشد.

با توجه به ساختار سوم پروتئینی ژن *virG*، شکل 4 ساختار سوم پیشگویی شده این ژن را در دو حالت طبیعی و جهش یافته نشان می‌دهد.



شکل4. تصویر پیشگویی ساختار سوم پروتئین VirG. پیشگویی در سایت Esy Pred 3D Web Server Status و بر اساس pDB No. 2QOM صورت گرفته و تصویر توسط نرم افزار VDM1.4.7 به صورت نمودار new cartoon طراحی شده است. الف- ساختار پیشگویی شده برای پروتئین طبیعی، ب- ساختار پیشگویی شده برای پروتئین جهش یافته

بحث

باکتری شیگلا متعلق به خانواده انتروباکتریاسه و عامل مسری‌ترین اسهال باسیلی می‌باشد (3-1). با توجه به فراونی بالا و نیز ظهور سویه‌های جدید مقاوم به آنتی‌بیوتیک و همچنین عدم موفقیت درمان‌های آنتی‌بیوتیکی، ساخت واکسن‌های موثر، کارا و ارزان در اولویت‌های سازمان بهداشت جهانی (WHO) قرار دارد (16).

تاکنون به منظور تهیه و تولید واکسن‌های مناسب علیه شیگلوز تلاش‌های متعددی توسط محققان صورت گرفته است، اما بنا به دلایلی مانند عدم ایمنی کافی و یا حفاظت نامناسب، عدم تحریک سیستم ایمنی میزبان، پیچیده بودن روند تولید و خالص‌سازی آن، بالا بودن هزینه‌های تولید آن، تاکنون این سویه‌های کاندید واکسنی نتوانسته‌اند مجوز استفاده را به صورت عمومی و در حجم وسیع دریافت کنند. امروزه ساخت واکسن‌های زیر واحدی و نیز سویه‌های کاندید واکسنی تهاجمی زنده تقلیل حدت یافته بیشترین نوید را انجام واکسیناسیون موثر ایجاد نموده اند (4، 6، 9). مزیت‌های دیگر شامل دریافت واکسن بدون نیاز به سوزن و فرآیند اقتصادی تولید است که باید در کشورهای در حال توسعه انجام شود. سویه‌های واکسن متعددی برای انواع سروتیپ‌های شیگلا معرفی شده که در آنها با استفاده از روش‌های مختلف ژن‌های خاصی حذف شده‌اند. یکی از ژن‌های مهم مورد توجه *virG* است که سویه‌های واکسن متعددی دارای جهش در این ژن هستند (5، 10، 17).

ژن *virG* در سال 1998 توسط هافمن و همکاران در سویه *شیگلا سونه‌ای* (Mosely) با به کارگیری روش تبادل آللی حذف گردید. آنها با استفاده از پلاسمید انتحاری pCVD442 که تنها 212 جفت از ژن *virG* در آن حذف شده بود توانستند طی دو مرحله انجام نوترکیبی در این ژن گسستگی ایجاد نمایند. یافته‌های بالینی این سویه کاندید واکسنی (WRSS1) حاکی از ایمنی‌زایی و حفاظت 100 درصدی در مدل حیوانی خوکچه هندی بود (21). سویه کاندید واکسنی SC602 از سویه والدی *شیگلا فلکسنری* 2a توسط در سال 1990 توسط سنزونتی و تامپسون ساخته شد. مطالعات ایمنی سنجشی و ارزیابی های بالینی آن در سال 2010 توسط *رحمان* و همکاران در بنگلادش بر روی 88 فرد بالغ و 79 کودک (8 تا 10 ساله) انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که هیچ کدام از داوطلبان دچار اسهال نشدند، اما درجه پایینی از تحریک سیستم ایمنی و واکنش مجدد (reactogeneticity) را از خود نشان دادند (9، 20).

در سال 2002 ونکاتسن و همکاران توانستند با استفاده از روش *هافمن* و همکاران در ژن *virG* ایجاد جهش نمایند، آنها به منظور حذف ژن عامل تولید سم شیگا توکسین از کشت مداوم بر روی محیط حاوی پرکلرات استفاده نمودند. تست Sereny این سویه کاندید واکسنی در مدل حیوانی منفی گزارش گردید و نیز در آزمون ایمنی حفاظتی پاسخ مناسبی از خود نشان داد (22).

نورجیا و همکاران با ایجاد جهش کروموزومی در مسیر بیوسنتزی پیش‌سازهای پورینی توانستند تاثیرات حاصل از آن را در نمونه‌های حیوانی ارزیابی نمایند. آنها در ابتدا با وارد نمودن جهش در اپرون *guaBA*، سویه کاندید واکسنی CVD1204 را تولید نموده و در ادامه این سویه را با سویه واکسنی CVD1203 که تنها فاقد ژن *aroA* بود مورد مقایسه قرار دادند. نتایج حاصل از این مقایسه نشان داد که قدرت تهاجمی سویه CVD1204 در سلول های هلا (Hella) و نیز پتانسل ایجاد التهاب کراتینی در چشم خوکچه هندی به طور قابل توجهی کاهش می یابد (23، 24).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-23]

بارونی و همکاران با مطالعه بر روی سویه های کاندید واکسنی WRSs2 و WRSs3 (سویه‌های کاندید واکسنی نسل دوم از سویه والدی *شیگلا سونه‌ای*) نشان دادند که به دلیل حذف نواحی ShET2-1 و ShET2-2 توانایی ایجاد اسهال در نمونه-های حیوانی و نیز به علت حذف ژن *MsbB2* علائم تب به طور قابل ملاحظه‌ای کاسته می‌گردد (19).

سدروژ و همکاران در سال 2008 سویه کاندید واکسنیSC599 از سویه *شیگلا دیسانتری* تیپ 1 حامل جهش حذفی در ژن‌های *virG*، *entF* (ژن مسئول بیوسنتز انتروکلین)، *fepA* (گیرنده دریافت کننده انتروکلین) و *fes* (مسئول رها سازی از Fe^{3+} از انتروکلین) و *stx* ایجاد گردید. در این تحقیق از پلاسمید از خود بین برنده pJM703/1 و کاست بیانی *npt1-sacB-sacR* استفاده شد. مطالعات بالینی سویه SC599 در سال 2009 توسط Launay و همکاران انجام گردید. مطالعات بالینی این سویه در داوطلبان انسانی نشان داد که حداکثر تحمل پذیری این سویه در دریافت کنندگان از (10^8CFU) بیشتر می‌باشد (25).

در مطالعه حاضر که با هدف ساخت سازه ژنی حامل جهش در ژن *virG* صورت گرفت از سویه *شیگلا دیسانتری* بومی به منظور تکثیر ژن *virG* استفاده گردید. این سویه به دلیل دارا بودن سم شیگا توکسین یکی از شدیدترین عفونت‌های باسیلی را در کودکان زیر پنج سال ایجاد می‌کند. ساختار جهش یافته pGEMΔ*virG* که در این تحقیق به دست آمد، شامل یک حذف 1751 جفت بازی در ژن *virG* است. این منطقه شامل بخش قابل توجهی از ناحیه عمل کننده و بخشی از ناحیه انتقال دهنده پروتئین می‌باشد که وظیفه آن عبور دادن بخش عمل کننده از غشاء خارجی سلول است. بنابراین، به نظر می-رسد با وجود چنین ناحیه حذف شده ای عملکرد طبیعی پروتئین VirG از بین رفته باشد. همانطور که پیشگویی ساختار پروتئین با استفاده از نرم افزار نیز در شکل 4 نشان می‌دهد، ساختار پروتئین جهش یافته نسبت به پروتئین طبیعی کاملا تغییر کرده است که مؤید عدم فعالیت طبیعی در پروتئین جهش یافته می‌باشد. ارزیابی‌های بیوانفورماتیکی بر روی پروتئین VirG نشان داده است که این پروتئین به لحاظ ویژگی های عملکردی از 3 ناحیه تشکیل شده است. بخش اول سیگنال ترشحی غیر طبیعی این ژن را شامل می-گردد ($VirG_{1-52}$)، بخش دوم ناحیه آلفا دومین ($VirG_{53-757}$) که به منظور پلیمریزاسیون مونومر های اکتینی میزبان مورد نیاز می باشد و در نهایت، ناحیه دومین بتا ($VirG_{758-1102}$) وظیفه تشکیل ساختار β-barrel (بشکه‌ای) را در غشای خارجی (OM) باکتری بر عهده دارد (19). حذف محدوده بین بازهای (1050 تا 2802) از ژن *virG* که در واقع شامل نواحی از بخش دوم و سوم این پروتئین می‌گردد (اسید آمینه های از شماره 350 تا 934)، می‌تواند به طور موثری باعث اختلال در عملکرد این ژن در باکتری *شیگلا دیسانتری* بومی گردد.

امروزه در دوران پس از ژنومیکس (Post genomics era) و با در اختیار داشتن توالی‌های ژنومی باکتری‌ها، روش‌هایی که مبتنی بر مهندسی ژنتیک معکوس هستند، بیشترین توجه را به خود جلب نموده‌اند. ایجاد جهش‌های هدفمند در ژنوم باکتری‌ها می‌تواند با اهداف مختلفی انجام پذیرد. ایجاد جهش در ژن *virG* یک روش مؤثر برای ساخت واکسن های زنده و تقلیل حدت یافته برای شیگلا است. از ساختار جهش یافته pGEMΔ*virG* می‌توان در جهت تهیه سویه‌های کاندید واکسنی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاران گروه صنعت و محیط زیست در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و همچنین مهندس زند در دانشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین (ع) و همچنین از اعضای مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی به خاطر همکاری‌های صمیمانه شان قدردانی می‌نماییم.

REFERENCES

1. Banish LD, Sims R, Sack D, Montali RJ, Phillips L Jr, Bush M. Prevalence of shigellosis and other enteric pathogens in a zoologic collection of primates. J Am Vet Med Assoc1993; 203: 126-32.
2. Kelly-Hope LA, Alonso WJ, Thiem VD, Anh DD, Canh do G, Lee H, et al. Geographical distribution and risk factors associated with enteric diseases in Vietnam. Am J Trop Med Hyg 2007; 76: 706-12.
3. Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and Shigella spp. Infect Immun 2004; 72: 5080-88.
4. Venkatesan MM, Ranallo RT. Live-attenuated Shigella vaccines. Expert Rev Vaccines 2006; 5: 669-86.
5. Ranallo RT, Thakkar S, Chen Q, Venkatesan MM. Immunogenicity and characterization of WRSF2G11: a second generation live attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine strain. Vaccine 2007; 25: 2269-78.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-23]

6. Girard MP, Steele D, Chaignat CL, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human enteric infections. Vaccine 2006; 24: 2732-50.

7. Venkatesan MM, Buysse JM, Kopecko DJ. Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from *Shigella flexneri*. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85: 9317-21.

8. Phalipon A, Sansonetti PJ. Shigellosis: innate mechanisms of inflammatory destruction of the intestinal epithelium, adaptive immune response, and vaccine development. Crit Rev Immunol 2003; 23: 371-401.

9. Sansonetti PJ. The bacterial weaponry: lessons from Shigella. Ann N Y Acad Sci 2006; 1072: 307-12.

10. Bernardini ML, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ. Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. Proc Natl Acad Sci U S A 1989; 86: 3867-71.

11. Lett MC, Sasakawa C, Okada N, Sakai T, Makino S, Yamada M, et al. virG, a plasmid-coded virulence gene of *Shigella flexneri*: identification of the virG protein and determination of the complete coding sequence. J Bacteriol 1989; 171: 353-59.

12. Suzuki T, Sasakawa C. Molecular basis of the intracellular spreading of Shigella. Infect Immun 2001; 69: 5959-66.

13. Coster TS, Hoge CW, VanDeVerg LL, Hartman AB, Oaks EV, Venkatesan MM, et al. Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602. Infect Immun 1999; 67: 3437-43.

14. May KL, Morona R. Mutagenesis of the *Shigella flexneri* autotransporter IcsA reveals novel functional regions involved in IcsA biogenesis and recruitment of host neural Wiscott-Aldrich syndrome protein. J Bacteriol 2008; 190: 4666-76.

15. Sakai T, Sasakawa C, Makino S, Yoshikawa M. DNA sequence and product analysis of the virF locus responsible for congo red binding and cell invasion in *Shigella flexneri* 2a. Infect Immun 1986; 54: 395-402.

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

17. Kotloff KL, Noriega FR, Samandari T, Sztein MB, Losonsky GA, Nataro JP, et al. *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1207, with specific deletions in virG, sen, set, and guaBA, is highly attenuated in humans. Infect Immun 2000; 68: 1034-39.

18. Venkatesan MM, Goldberg MB, Rose DJ, Grotbeck EJ, Burland V, Blattner FR. Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. Infect Immun 2001; 69: 3271-85.

19. Barnoy S, Baqar S, Kaminski RW, Collins T, Nemelka K, Hale TL, et al. *Shigella sonnei* vaccine candidates WRSs2 and WRSs3 are as immunogenic as WRSS1, a clinically tested vaccine candidate, in a primate model of infection. Vaccine 2011;29: 6371-78.

20. Rahman KM, Arifeen SE, Zaman K, Rahman M, Raqib R, Yunus M, et al. Safety, dose, immunogenicity, and transmissibility of an oral live attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine candidate (SC602) among healthy adults and school children in Matlab, Bangladesh. Vaccine 2011; 29: 1347-54.

21. Hartman AB, Venkatesan MM. Construction of a stable attenuated Shigella sonnei DeltavirG vaccine strain, WRSS1, and protective efficacy and immunogenicity in the guinea pig keratoconjunctivitis model. Infect Immun 1998; 66: 4572-76.

22. Venkatesan MM, Hartman AB, Newland JW, Ivanova VS, Hale TL, McDonough M, et al. Construction, characterization, and animal testing of WRSd1, a *Shigella dysenteriae* 1 vaccine. Infect Immun 2002; 70: 2950-58.

23. Noriega FR, Losonsky G, Wang JY, Formal SB, Levine MM. Further characterization of delta aroA delta virG Shigella flexneri 2a strain CVD 1203 as a mucosal Shigella vaccine and as a live-vector vaccine for delivering antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun 1996; 64: 23-27.

24. Noriega FR, Wang JY, Losonsky G, Maneval DR, Hone DM, Levine MM. Construction and characterization of attenuated delta aroA delta virG *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203, a prototype live oral vaccine. Infect Immun 1994; 62: 5168-72.

25. Sadorge C, Ndiaye A, Beveridge N, Frazer S, Giemza R, Jolly N, et al. Phase 1 clinical trial of live attenuated *Shigella dysenteriae* type-1 DeltaicsA Deltaent Deltafep DeltastxA:HgR oral vaccine SC599 in healthy human adult volunteers. Vaccine 2008; 26: 978-87.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-11-23]