Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2012; 15(61): 35-47

Construction of pDS132::Δ*icsA* for targeted deletion of a region of *icsA* gene in order to generate a live attenuated *Shigella* vaccine

Hosseini SM(MSc)[1*], Saadati M(PhD)[2], Yakhchaly MB(PhD)[3], Nayeri Fasaei B(PhD)[4], Ahmadidanesh H(M.Sc)[3], Mirzaei M(M.Sc)[1], Baghery K(M.Sc)[5], Zare M(M.Sc)[2]

1- Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran
3- Department of Industry and Environment, Research Center of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
4- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
5- Applied Microbiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 28Feb 2011, Accepted: 28 Jun 2011

Abstract

Background: Live attenuated *Shigella* vaccines have shown promise in inducing protective immune responses in human clinical trials. The aim of this study was to design and construct pDS132::Δ*icsA* as a suicide plasmid for targeted deletion of a region of *icsA* gene in *Shigella*.

Materials and Methods: In this experimental study, species and serotypes of *Shigella* isolated from diarrhea samples of children at Firozabadi and Milad Hospitals of Tehran were confirmed by using serological and PCR tests. Identification primers of *icsA* gene were designed and then cloned to the pGEM-5zf vector and sequenced. According to *icsA* restriction enzyme map, 1751 bp of *icsA* gene was deleted by *Hinc*II restriction enzyme and the Δ*icsA* was constructed successfully. The pGEMΔ*icsA* vector was digested by use of *Sph*I and *Sal*I enzymes and was then cloned to a suicide vector (pSD132). Precision of the process was confirmed by phenotype and genotype tests.

Results: The *Shigella dysenteriae* type 1 strain was verified by serological tests and PCR. Sequence of the *icsA* gene in the native strain was identical to the strains submitted in the gene-bank database. Since the pDS132::Δ*icsA* contains 1484 bp derived from *icsA* gene, it can be used to disrupt *icsA* gene as a specific suicide vector.

Conclusion: Application of suicide systems facilitated mutant construction in more specific and effective methods in comparison with the other primary techniques such as serial passage.

Keywords: Allelic exchange, IcsA, *Shigella* dysenteriae type 1, Shigellosis, Suicide vector

*Corresponding author:
Address: Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: Geneticman2005@gmail.com

مقاله پژوهشی
مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک
سال 15، شماره 2 (شماره پیاپی 61)، خرداد و تیر 1391، 47-35

ساخت پلاسمید pDS132::Δ*icsA* جهت حذف هدفمند نواحی از ژن *icsA* به منظور تولید واکسن زنده تخفیف حدت یافته شیگلا

سید مصطفی حسینی[1*]، مجتبی سعادتی[2]، محمد باقر یخچالی[3]، بهار نیری فسایی[4]، حورا احمدی دانش[5]، مرتضی میرزایی[1]، کمال باقری[6]، مختار زارع[7]

1- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
2- استاد، دکتری باکتری شناسی، گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران
3- دانشیار، دکترای میکروبیولوژی، گروه صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران
4- استادیار، دکتری میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
5- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، گروه صنعت و محیط زیست پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران
6- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
7- کارشناس ارشد سلولی و مولکولی، گروه علوم زیستی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران

تاریخ دریافت:89/12/10 تاریخ پذیرش: 90/4/8

چکیده

زمینه و هدف: واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته شیگلا پاسخ‌های امیدبخشی در ایجاد ایمنی حفاظتی در آزمایشات بالینی بر روی انسان را نشان داده‌اند. هدف از این تحقیق طراحی و ساخت پلاسمید pDS132::Δ*icsA* به عنوان یک ناقل انتحاری برای حذف هدفمند بخشی از ژن *icsA* در شیگلا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، گونه و سروار شیگلای جدا شده از نمونه‌های کودکان مبتلا به اسهال، در بیمارستان‌های فیروزآبادی و میلاد تهران، با استفاده از آزمایش سرم شناسی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد تایید قرار گرفت. آغازگرهای شناسایی ژن *icsA* طراحی و سپس در حامل pGEM-5zf همسان سازی و تعیین توالی گردید. بر اساس نقشه برش آنزیمی ژن *icsA*، 1751 جفت باز از ژن *icsA* با استفاده از آنزیم محدودکننده *Hinc*Π حذف و ژن جهش یافته Δ*icsA* به طور موفقیت آمیزی ایجاد گردید. حامل pGEMΔ*icsA* با استفاده از آنزیم‌های *Sph*I و *Sal*I هضم گردید و سپس در حامل انتحاری (pSD132) همسانه سازی شد. صحت فرآیند با آزمایش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی تایید گردید.

یافته‌ها: سویه *شیگلا دیسانتری* تیپ1 با آزمایش سرولوژیکی و PCR تایید گردید. توالی ژن *icsA* سویه بومی با سویه‌های ثبت شده در بانک ژنی یکسان بود. حامل انتحاری pDS132::Δ*icsA* با در بر داشتن 1484 جفت باز، مشتق شده از ژن *icsA* می تواند به عنوان یک ناقل انتحاری اختصاصی در ایجاد تداخل در ژن *icsA* به کار رود.

نتیجه‌گیری: استفاده از سیستم‌های انتحاری ایجاد جهش هدف مند را تسهیل و در مقایسه با سایر تکنیک‌های اولیه مانند پاساژ متوالی روش اختصاصی و موثرتری می‌باشد.

واژگان کلیدی: تبادل آللی، ژن *icsA* ، *شیگلا دیسانتری* تیپ 1، شیگلوز، ناقل انتحاری

***نویسنده مسئول:** تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی
Email: Geneticman2005@gmail.com

مقدمه

شیگلا دیسانتری تیپ 1 باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و بدون اسپور می‌باشد که به خانواده انتروباکتریاسه تعلق دارد(1). بیماری که توسط شیگلا ایجاد می‌شود شیگلوز نام دارد. شیگلوز یک بیماری عفونی است که قسمتی از روده کوچک را تحت تاثیر قرار می‌دهد. شیگلوز با علائمی مانند اسهال آبکی به همراه مقادیر مختلفی از خون و مخاط، تب، حالت تهوع، استفراغ، گرفتگی و درد شکمی تشخیص داده می‌شود(2 ،3). در بین گونه‌های شیگلا، شیگلا *دیسانتری* تیپ 1 علاوه بر علائم فوق، از طریق ناهنجاری سیستم اعصاب مرکزی، تشنج و سندرم همولایتیک-اورمیک (Hemolytic Uremic Syndrome-HUS) نیز قابل تشخیص می‌باشد(1).

شیگلا از نظر ژنتیکی بسیار شبیه اشریشیاکلی می‌باشد که گاهی حتی از آن به عنوان اشریشیاکلی بیماری‌زا یاد می‌شود(3). حدود 99 درصد عفونت‌های شیگلا در مناطق در حال توسعه رخ می‌دهد و سالانه حدود 1/1 میلیون نفر از مبتلایان به شیگلوز می‌میرند که 60 درصد آنها را کودکان زیر 5 سال تشکیل می‌دهند(4، 5).

شیگلا پس از ورود به بدن میزبان، ناحیه راست روده و کولون را در دستگاه گوارش هدف قرار می‌دهد، سپس قادر است این تهاجم را به سلول‌های پوششی غیر فاگوسیتی نیز گسترش دهد. این فرایند از طریق پروتئین‌هایی صورت می‌گیرد که در تمام سویه‌های بیماری‌زا به شدت حفاظت شده هستند. این پروتئین‌ها توسط یک پلاسمید بزرگ 213 کیلوبازی رمز می‌گردند که از آن به عنوان پلاسمید تهاجمی و یا پلاسمید بیماری‌زا یاد می‌شود(6، 7). هر باکتری نهایتاً درون یک واکوئل اندوسیتوزی بلعیده شده و سپس با پاره کردن واکوئل به درون سیتوپلاسم سلول پوششی میزبان رها می‌گردد و پس از تکثیر در آنجا، به کمک پروتئین IcsA (Intra Cellular Spreading A)، که به نام VirG نیز شناخته می‌شود، به سمت سلول‌های پوششی مجاور حرکت می‌کند(10-8).

پروتئین IcsA از سه بخش تشکیل شده است که بخش انتهایی آن با پروتئین N-WASP (neural Wiskott–Aldrich syndrome protein) میزبان وارد واکنش شده و با فعال کردن کمپلکس Arp 2/3 در سیتوپلاسم، موجب پلیمریزه شدن اکتین‌های گلوبولی به شکل اکتین رشته‌ای (F-actin) می‌شود که نتیجه آن، گسترش آلودگی در بدن میزبان است(11). یاخته‌های شیگلا که دارای نقص در ژن *icsA* هستند در تمام مدل‌های حیوانی قدرت بیماری‌زایی کمتری دارند به طوری که در نهایت از طریق جریان گلبول‌های سفید چند هسته‌ای (polymorphonuclear leukocytes-PMN)، از بدن میزبان حذف می‌گردند و بدین نحو عفونت از بین می‌رود. بنابراین جهش در ژن *icsA* محور اصلی کاهش بیماری‌زایی در چندین سویه واکسن تقلیل حدت یافته می‌باشد(12).

روش‌های مختلفی جهت حذف و غیر فعال نمودن ژن‌ها در باکتری‌ها گزارش شده است که برای درک بیولوژی مولکولی، فیزیولوژی، تنظیم ژنتیکی و بیماری‌زایی ارگانیسم‌ها بسیار حائز اهمیت است(16-13). روش‌های اولیه‌ای که برای ایجاد سویه‌های تخفیف حدت یافته به منظور تولید واکسن در باکتری و ویروس‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار می‌گرفت شامل پاساژهای متوالی و جهش‌زایی با مواد شیمیایی بود. این روش‌ها فاقد اختصاصیت بودند، به همین دلیل توسط تکنیک‌های پیشرفته‌تر مهندسی ژنتیک و نوترکیبی هومولوگ که بر مبنای حذف هدفمند ژن‌های بیماری‌زا استواراند جایگزین گردیدند که اغلب، از این فرآیندها به عنوان مهندسی ژنتیک معکوس تعبیر می‌شود. یکی از روش‌های جدید در مهندسی ژنتیک، استفاده از ناقل‌های انتحاری به منظور ایجاد گسستگی در ژن هدف با تکیه بر رخداد تبادل آللی در باکتری‌ها می‌باشد(20-17). امروزه یکی از روش‌هایی که به منظور فائق آمدن بر نگرانی‌های مربوط به دست ورزی ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها (genetically engineered microorganisms-GEMs) مطرح می‌گردد به کارگیری

سویه‌هایی است که تنها در شرایط خاص محیطی قادر به حفظ بقای خود باشند. روشی که امروزه به این منظور کاربرد وسیعی در ایجاد جهش‌های اختصاصی و هدفمند پیدا کرده است به کارگیری سیستم‌های انتحاری (suicide) است(17).

با توجه به بیماری‌زایی و شیوع نسبتاً بالای شیگلوز در کشورهای در حال توسعه و ناموفق بودن روش‌های درمان آنتی‌بیوتیکی، اهمیت پیشرفت روش‌های پیش‌گیرانه مانند واکسیناسیون افراد و به خصوص کودکان در اولویت سازمان بهداشت جهانی(WHO) قرار دارد(21). امروزه یکی از موثرترین نوع واکسن‌های خوراکی، تهیه سویه‌های مهاجم تخفیف حدت یافته است که اثرات بالینی قابل قبولی را دارا می‌باشند(22). در این تحقیق با توجه به اهمیت و نقش این ژن در سویه *شیگلا دیسانتری* تیپ 1، به منظور ایجاد جهش جهت تولید واکسن بومی، انتخاب گردید. هدف از انجام این تحقیق ساخت پلاسمید انتحاری pDS132::Δ*icsA* به منظور ایجاد جهش در ژن *icsA* با هدف ایجاد سویه زنده تخفیف حدت یافته در سویه *شیگلا دیسانتری* تیپ 1 جدا شده از نمونه‌های بیمارستان‌های میلاد، مفید و حضرت علی اصغر (ع) تهران بود.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی از سویه‌ها، ناقل‌ها و موارد زیر استفاده گردید. در ابتدا، باکتری *شیگلا دیسانتری* تیپ 1 از بیماران مبتلا به اسهال خونی در بیمارستان‌های میلاد و فیروزآبادی تهران، جدا شدند. نمونه‌های تهیه شده، با استفاده از سوآب‌های استریل در محیط سالمونلا – شیگلا آگار، در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت و به مدت 16 ساعت انکوبه شدند. سپس نمونه‌ها توسط آزمون‌های بیوشیمیایی اورنیتین دکربوکسیلاز، هکتوئن، زایلوز لایزین دکربوکسیلاز، مک کانکی، TSI، ONPG، آزمون تخمیر قند آرابینوز و تولید اندول شناسایی و پس از کشت در محیط LB مایع و افزودن گلیسرول (غلظت نهایی20 درصد) در دمای 80- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

سویه‌های شیگلا جدا شده از بیماران پس از انجام آزمایشات بیوشیمیایی، هم‌چنین با استفاده از کیت تشخیصی پلی کلونال گونه‌های شیگلا (شرکت Mast، انگلستان)، تایید شد. برای این منظور ابتدا سویه‌های شیگلا بر روی محیط مک کانکی آگار کشت داده شدند و سپس آزمایشات شناسایی گونه با استفاده از روش آگلوتیناسیون بر روی شیشه اجرا گردید(23).

به منظور شناسایی سروار شیگلا جدا شده یک جفت آغازگر اختصاصی برای تشخیص حضور ژن زیر واحد A شیگا توکسین (*stxA*) با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژنی طراحی و سنتز گردید (سینا کلون، ایران). توالی آغازگرهای بالادست و پایین دست تشخیص ژن زیر واحد A شیگا توکسین عبارت بودند از:

STXF: 5' GGGATAGATCCAGAGGAAGG 3'
STXR:5'CCGGACACATAGAAGGAAACTC 3'

آغازگرهای بالادست و پایین دست ژن *icsA* بدون جایگاه برش آنزیمی به منظور همسانه سازی ژن *icsA* در حامل pGEM-5zf با توجه به اطلاعات موجود در بانک ژنی طراحی و سنتز گردید (سیناکلون، ایران). توالی آغازگرهای بالادست و پایین دست عبارت بودند از :

ICSAF: 5' GGAGAATTACCTACGGTAAAGG 3'
ICSAR: 5' CACCCAAAATACCTTGGGTGTC 3'

آماده سازیDNA باکتری: پس از شناسایی اولیه سویه *شیگلا دیسانتری* نسبت به کشت آن در محیط LB مایع اقدام گردید و نمونه به مدت 18 ساعت در گرم خانه شیکردار با سرعت 200 دور در دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. ژنوم باکتری با استفاده از کیت تخلیص ژنومی *AccuPrep* (کره جنوبی، BioNEER) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید و با انجام واکنش PCR وجود ژن زیر واحد A شیگا توکسین و نیز ژن *icsA* مورد تایید قرار گرفت.

به منظور تکثیر ژن زیر واحد A شیگا توکسین باکتری شیگلا، DNA به دست آمده از مرحله قبل، به

کمک واکنش PCR و آغازگرهای اختصاصی سروار شیگلا *دیسانتری* تیپ 1 تکثیر شد. واکنش PCR به منظور تکثیر DNA در حجم 50 میکرولیتر انجام گرفت. هر واکنش شامل 0/4 میکرومول از هر آغازگر، 0/2 میلی‌مولار از مخلوط نوکلئوتیدهای dATP، dCTP، dGTP، dTTP و 2/5 واحد از آنزیم DNA پلی مراز *Pfu*، 5 میکرولیتر از بافر x 10، $MgCl_2$ با غلظت نهایی 2/5 میلی‌مولار و 50 نانوگرم DNA (با غلظت نهایی 302/5 میکروگرم در هر میلی‌لیتر) بود. چرخه‌های PCR شامل مرحله واسرشت شدن ابتدایی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 3 دقیقه و دوره سه مرحله‌ای شامل واسرشت شدن ابتدایی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای 58 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، طویل سازی قطعه مورد نظر در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه و در پایان، مرحله تکثیر نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 7 دقیقه بود. محصول PCR پس از رنگ آمیزی در اتیدیوم بروماید (با غلظت نهایی 25 میکروگرم در هر میلی‌لیتر) بر روی ژل آگارز 1درصد به کمک مارکر مولکولی مورد تایید قرار گرفت.

تکثیر ژن *icsA* و آماده سازی محصول PCR:

به منظور همسانه سازی ژن *icsA* در حامل pGEM-5zf دستور العمل PCR مطابق مرحله قبل، اجرا گردید با این تفاوت که مدت زمان طویل سازی 6 دقیقه و 45 ثانیه و دمای اتصال آغازگرها 55 درجه سانتی‌گراد انتخاب شد. به منظور آماده سازی محصول PCR، DNA تکثیر شده با استفاده از کیت High Pure PCR Product (Purification Kit ,Roche، آلمان) خالص سازی و جهت همسانه سازی برای الحاق آماده گردید.

آماده سازی حامل pGEM-5zf: هضم آنزیمی حامل pGEM-5zf با استفاده از آنزیم *Hinc*Π (فرمنتاز) در واکنش هضم یک گانه با 2/5 میکرولیتر از بافر 10x، 10 میکرولیتر از حامل pGEM-5zf، 2 میکرولیتر از آنزیم محدود کننده به طوری که حجم واکنش به 25 میکرولیتر برسد، تهیه و سپس به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا پس از انجام برش، پلاسمید خطی برش خورده با انتهای صاف ایجاد شود.

به منظور الحاق نیز مخلوط محصول PCR و پلاسمید برش خورده با نسبت 1 به 3 تهیه و به مدت 10 دقیقه در 37 درجه سانتی‌گراد گرمادهی گردید و بلافاصله به ظرف یخ منتقل شد. سپس 2 میکرولیتر از آنزیم لیگاز T_4 و 5 میکرولیتر از بافر 10x به آن اضافه و به مدت 16 ساعت در دمای 10 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول واکنش الحاق در نهایت توسط کیت کیاژن (,PCR cleanup kit QIAGEN، آمریکا) به منظور انجام تراریخت استخراج گردید.

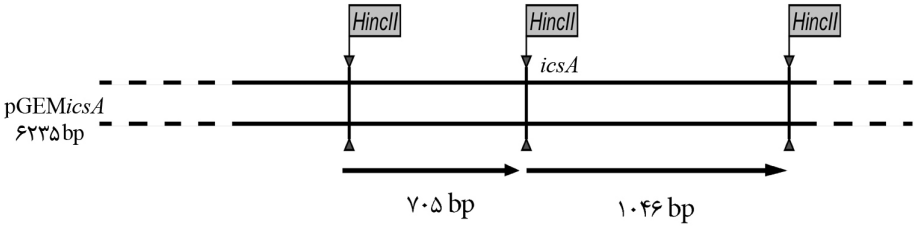
تراریختی: پلاسمیدهای نوترکیب با روش شوک الکتریکی به یاخته مستعد *E. coli* سویه DH5α تراریخت گردید. برای این کار ابتدا سلول‌های مستعد پذیرنده الکتریکی مطابق روش (*سمبروک و همکاران*، 1989) تهیه و سپس 30 میکرولیتر از این سلول‌ها با 5 میکرولیتر از پلاسمید نوترکیب، مخلوط و به مدت 1 دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس با انجام شوک الکتریکی (2/0 کیلو ولت در میلی ثانیه) به سلول‌های DH5α منتقل و به آن محیط SOC بدون آنتی بیوتیک اضافه و به مدت 60 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. باکتری‌های رشد کرده با دور 4000 دور در دقیقه سانتریفیوژ و در محیط LB جامد حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت 18 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به صورت چمنی کشت داده شدند.

صحت همسانه سازی پرگنه‌های حاوی قطعه مورد نظر، به کمک PCR و در نهایت توالی یابی تایید گردیدند. برای انجام این کار، پلاسمید باکتری با استفاده از کیت *AccuPrep* (Plasmid Extraction Kit ,BioNEER، کره جنوبی) استخراج و مطابق روش قبل، واکنش PCR اجرا گردید. پلاسمیدهای مثبت پس از خالص سازی توسط آغازگرهای عمومی M13 حامل و آغاز گرهای طراحی

شده به منظور تکثیر ژن *icsA* و برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست (ایران) فرستاده شد.

هضم آنزیمی و تایید حذف بخشی از ژن

***icsA* :** ناقل پلاسمیدی pGEM-5zf بعد از همسانه سازی با کاست ژنی *icsA*، فاقد جایگاه برش برای آنزیم *Hinc*II می‌باشد. بنابراین، هضم آنزیمی حامل pGEM*icsA* با استفاده از آنزیم *Hinc*II (فرمنتاز) در واکنش هضم یک گانه با 2/5 میکرولیتر از بافر 10x، 10 میکرولیتر از حامل pGEM*icsA*، 2 میکرولیتر از آنزیم محدود کننده به طوری که حجم واکنش به 25 میکرولیتر برسد، تهیه و سپس به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد(شکل1). پس از اتمام زمان گرمادهی، محصول واکنش هضم بر روی ژل آگارز 2 درصد الکتروفورز گردید. حامل pGEMΔ*icsA*، از روی ژل با استفاده از کیت کیاژن (Gel Purification kit ,QIAGEN، آمریکا) خالص سازی و واکنش خود اتصالی مطابق مرحله قبل اجرا و در حامل اشریشیاکلی سویه DH5α تراریخت شد. پرگنه‌های مقاوم به آمپی سیلین (غلظت نهایی80 میکروگرم در میلی‌لیتر) در محیط LB غربالگری و حذف بخشی (1484 bp) از ژن *icsA* با استفاده از واکنش PCR و تعیین توالی تایید گردید.



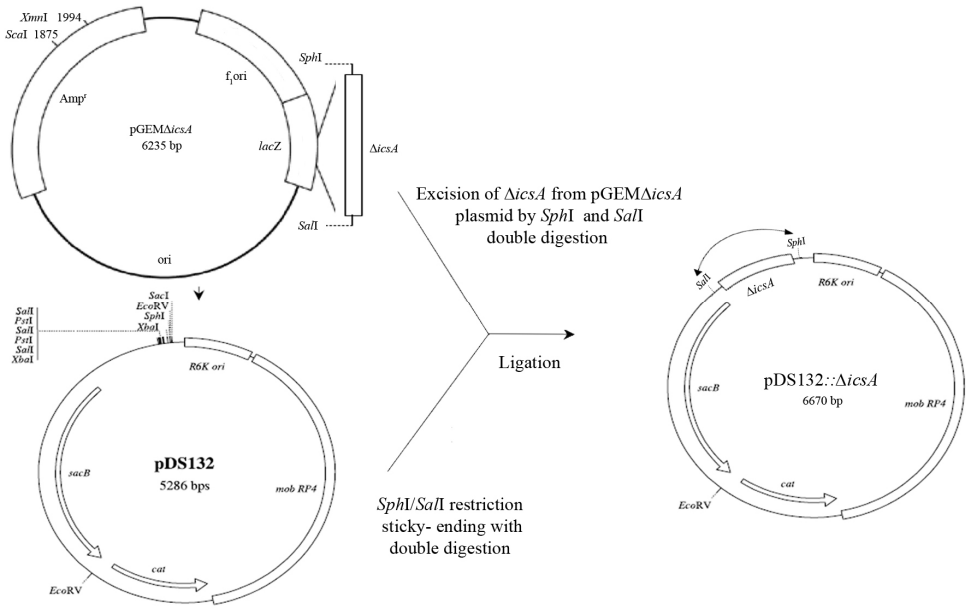
شکل 1. نقشه جایگاه های برشی ژن *icsA* با استفاده از آنزیم محدود کننده *HincII*. همانطور که در تصویر بالا مشاهده می‌گردد ژن *icsA* دارای سه سایت برشی برای آنزیم محدود کننده *HincII* می‌باشد، به طوری که پس از برش با این آنزیم سه قطعه 705، 1046 و 1484 جفت بازی (1484=1751-3235) به ترتیب، ایجاد می‌گردد.

جداسازی کاست ژنی از حامل pGEMΔ*icsA*:

با توجه به جایگاه‌های برش آنزیمی حامل انتحاری pSD132 و ژن *icsA*، واکنش هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *Sal*I و *Sph*I اجرا گردید. در واکنش هضم دوگانه از 5 میکرولیتر بافر 10x، 10 میکرولیتر از حامل pGEMΔ*icsA* و 2 میکرولیتر از هر آنزیم در حجم واکنش 50 میکرولیتر و به مدت دو ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار گرفت تا انتهای چسبناک در انتهای'3 و '5 کاست ایجاد گردد. محصول برش خورده توسط کیت کیاژن (Gel Purification kit QIAGEN، آمریکا) پس از الکتروفورز بر روی ژل 2 درصد خالص سازی گردید و برای واکنش الحاق در حامل انتحاری pSD132 آماده شد.

الحاق و تراریختی: به منظور همسانه سازی کاست ژنی، واکنش هضم آنزیمی دوگانه با استفاده از آنزیم‌های محدود کننده *Sal*I و *Sph*I مطابق مرحله قبل اجرا گردید با این تفاوت که از حامل pSD132 به به عنوان DNA الگو استفاده گردید. به منظور انجام واکنش الحاق، مخلوط کاست ژنی و پلاسمید برش خورده (pSD132) با نسبت 1 به 3 تهیه و به مدت 10 دقیقه در 37 درجه سانتی‌گراد گرمادهی گردید و بلافاصله به ظرف یخ منتقل شد و سپس 2 میکرولیتر از آنزیم لیگاز T_4 و 5 میکرولیتر از بافر 10x به آن اضافه و به مدت 16 ساعت در دمای 10 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول واکنش الحاق در نهایت پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1/8 درصد توسط کیت کیاژن (PCR cleanup kit, QIAGEN، آمریکا) استخراج گردید. واکنش تراریختی مطابق مرحله

قبل انجام شد با این تفاوت که از میزبان اشرشیا کلی SM10 *λpir* استفاده گردید. سویه SM10 *λpir* به عنوان هدف انتخاب شد تا پلاسمید انتحاری pSD132 با منشأ *R6K* به میزان کافی تکثیر شود. سویه تولید شده می‌تواند به منظور القای تبادل آللی و حذف بخشی از ژن *icsA*، در سویه وحشی شیگلا *دیسانتری* تیپ 1 به منظور ایجاد گسستگی (حذف) در ژن حدت زای *icsA* به کارگیری گردد(شکل 2).

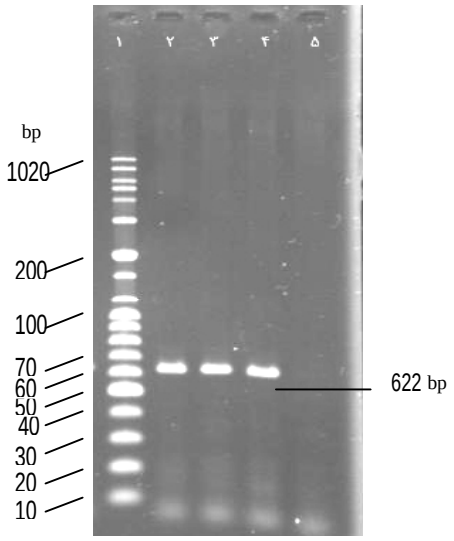


شکل 2. خلاصه مراحل ایجاد ناقل pSD132Δ*icsA*. پس از همسانه سازی و حذف 1751 جفت باز از ژن *icsA*، قطعه 1484 جفت بازی باقیمانده از ژن *icsA* در ناقل انتحاری pSD132 مجدداً همسانه سازی گردید.

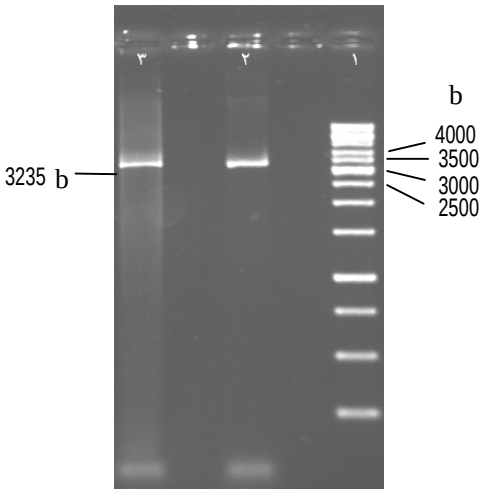
به منظور تایید فنوتیپی و ژنوتیپی حامل pDS132::Δ*icsA* ، سویه‌های اشرشیا کلی تراریخت شده با حامل pDS132::Δ*icsA* بر روی محیط LB دارای آنتی بیوتیک کلرامفنیکل با غلظت 12/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر به صورت چمنی کشت داده شد و سپس سویه مقاوم جداسازی و واکنش PCR و تعیین توالی به منظور تایید صحت فرآیندهای فوق انجام گردید.

یافته‌ها

به منظور شناسایی و تعیین گونه و سروار باکتری‌های شیگلا از واکنش‌های بیوشمیایی، آنتی سرمی و PCR استفاده شد. نتایج واکنش‌های بیوشیمیایی و آنتی سرمی گونه شیگلا *دیسانتری* را، در نمونه‌های دریافتی از بیمارستان‌های میلاد، مفید و حضرت علی اصغر(ص) تهران نشان داد. به منظور تعیین سروار گونه‌های شیگلا، ژن زیر واحد A شیگا توکسین (مختص شیگلا *دیسانتری* تیپ 1) با انجام روش PCR و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز 1 درصد تایید گردید (شکل 3، ستون‌های 2، 3 و 4). حضور ژن *icsA* از طریق واکنش PCR، تکثیر و بر روی ژل آگاروز 1 درصد مورد مطالعه قرار گرفت، همان طور که در شکل 4 مشاهده می‌شود، قطعه مورد نظر از لحاظ اندازه با ژن هدف ما هم‌خوانی داشت (ستون 2و3، قطعه 3235 bp).

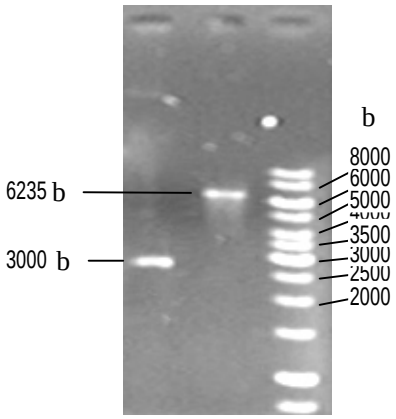


شکل 3. الکتروفورز محصول PCR تشخیص ژن زیر واحد A شیگا توکسین روی ژل آگاروز 1درصد. 1) نشانگر وزن مولکولی 100 bp DNA (کره جنوبی، BioNEER)، 2) محصول PCR ژن زیر واحد A شیگا توکسین در باکتری شماره 1 (قطعه bp 622)، 3) محصول PCR ژن زیر واحد A شیگا توکسین در باکتری شماره 2 (قطعه bp 622))، 4) محصول PCR ژن زیر واحد A شیگا توکسین در باکتری شماره 3 (قطعه bp 622)، 5) محصول PCR سویه *شیگلا فلکسنری*2b (ATCC12022) به عنوان کنترل منفی

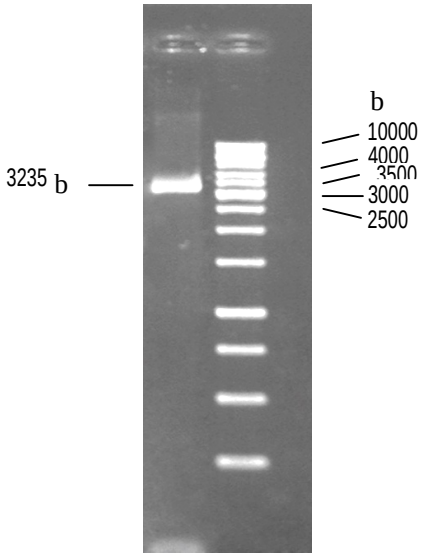


شکل 4. الکتروفورز محصول PCR تشخیص ژن *icsA* بر روی ژل آگاروز 1درصد. 1) نشانگر وزن مولکولی 1 Kb DNA (آلمان، فرمنتاز)، 2) محصول PCR ژن *icsA* در باکتری شماره 1 (قطعه bp 3235) با استفاده از آنزیم DNA پلی مراز *Pfu*، 3) محصول PCR ژن *icsA* در باکتری شماره 1 (قطعه bp 3235) با استفاده از آنزیم DNA پلی مراز *Taq*

جهت خطی نمودن حامل pGEM-5zf به منظور الحاق ژن *icsA*، از واکنش هضم آنزیمی توسط *HincΠ* استفاده شد، در اثر برش آنزیمی حامل pGEM-5zf ، قطعه 3000 جفت بازی با انتهای صاف به دست آمد (شکل 5، ستون 3). پس از الحاق ژن *icsA* در حامل pGEM-5zf، اندازه قطعه مشاهده شده بر روی ژل آگاروز 1 درصد مطابق انتظار بود (ستون 5، قطعهbp 6235). برای تایید همسانه سازی واکنش PCR ، انجام و بر روی ژل آگاروز 1 درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. تشکیل قطعه 6235 جفت بازی صحت همسانه سازی ساختار pGEM*icsA* را نشان داد (شکل 6، ستون 2). به منظور تایید بیشتر همسانه pGEM*icsA* با آغازگرهای عمومی M13 حامل، توالی یابی گردید. نتایج، مشابهت 100 درصد ژن *icsA* سویه بومی با توالی استاندارد (شماره دسترسی CP000035) در بانک ژنی را نشان داد.

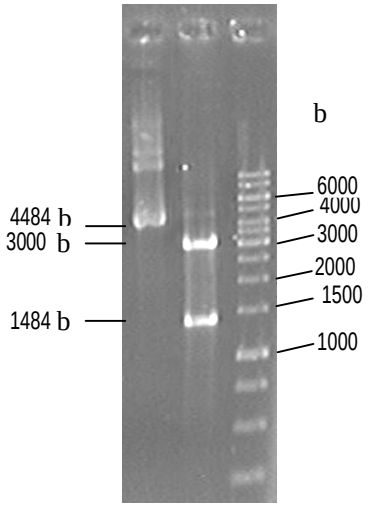


شکل 5. الکتروفورز محصول الحاق ژن *icsA* و هضم آنزیمی حامل pGEM-5zf بر روی ژل آگاروز 1/8 درصد. 1) نشانگر وزن مولکولی 1Kb DNA (آلمان، فرمنتاز)، 2) محصول واکنش الحاق ژن *icsA* به حامل pGEM-5zf، 3) برش آنزیمی حامل pGEM-5zf با استفاده از آنزیم محدود کننده *HincΠ*، قطعه 3000bp نشان دهنده خطی شدن حامل پیش از انجام واکنش الحاق می‌باشد



شکل 6. الکتروفورز محصول PCR پلاسمید نوترکیب pGEM*icsA*بر روی ژل آگاروز 1/8 درصد. 1) نشانگر وزن مولکولی1 Kb DNA (آلمان، فرمنتاز)، 2) محصول PCR ژن *icsA* با استفاده از آغازگر های شناسایی ژن *icsA* ، تشکیل قطعه 3235 bp صحت همسانه سازی را تایید نمود

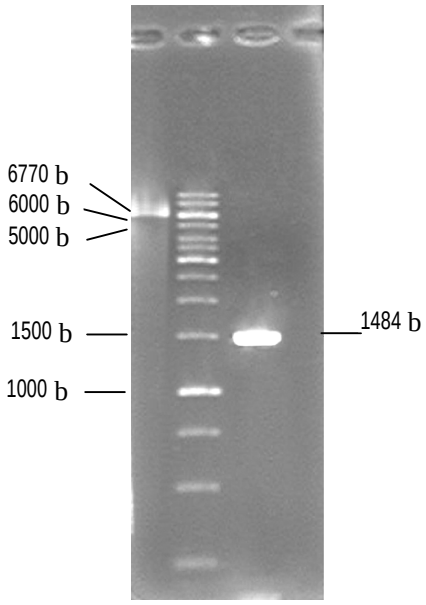
در ادامه به منظور ایجاد حذف بخشی از ژن *icsA*، آنالیز رایانه‌ای با استفاده از نرم افزار DNASIS نشان داد که این ژن در 3 جایگاه دارای سایت برشی برای آنزیم *Hinc*Π می‌باشد، به طوری که بعد از برش آنزیمی و انجام واکنش خود اتصالی (self ligation) قطعه 4484 جفت بازی (pGEMΔ*icsA*) بر روی ژل آگارز مشاهده گردید (شکل7، ستون 3). به منظور الحاق ژن جهش یافته Δ*icsA* در ناقل انتحاری pSD132، پلاسمید نوترکیب pGEMΔ*icsA* با استفاده از دو آنزیم *Sph*I و *Sal*I هضم گردید و قطعه مورد نظر (1484 bp) بر روی ژل آگارز 1/8 درصد مشاهده و سپس به منظور همسانه سازی در ناقل pSD132 خالص سازی گردید(شکل7، ستون 2).



شکل 7. الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pGEMΔ*icsA*با آنزیم های محدودکننده *Sph*I و *Sal*I و محصول واکنش خود اتصالی حامل pGEM*icsA* پس از برش آنزیمی با آنزیم محدود کننده *HincII* بر روی ژل آگاروز 2 درصد. 1) نشانگر وزن مولکولی 1Kb DNA (آلمان، فرمنتاز)، 2) برش پلاسمید نوترکیب pGEMΔ*icsA* با آنزیم های *Sph*I و *Sal*I، محصول 1484 جفت بازی صحت هضم آنزیمی قطعه Δ*icsA* از پلاسمید نوترکیب pGEM*icsA* را نشان می‌دهد، 3) محصول واکنش خود اتصالی پلاسمید pGEMΔ*icsA* پس از برش آنزیمی با آنزیم *HincII*، قطعه 4484 جفت بازی حذف 1751 جفت باز از ژن *icsA* را تایید می نماید

در ادامه پس از الحاق قطعه مورد نظر در ناقل pDS132 و تراریخت آن به داخل سلول‌های میزبان اشرشیا کلی *λpir* SM10، عمل استخراج پلاسمید از پرگنه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل صورت پذیرفت، همان طور که در شکل 8 نشان داده شده است، حضور قطعه 6670 جفت بازی، صحت الحاق ژن جهش یافته (Δ*icsA*) را در پلاسمید نوترکیب pSD132 نشان می‌دهد (شکل 8 ستون 3، قطعه 6670 bp). در ادامه به منظور تایید حضور سازه ژنی Δ*icsA* در ناقل انتحاری نوترکیب pSD132Δ*icsA* واکنش PCR اجرا گردید که نتیجه آن حضور قطعه 1484 جفت بازی از سازه ژنی Δ*icsA* را تایید نمود (شکل 8، ستون 1)، سپس توالی یابی با دو آغاز گر طراحی شده برای نواحی مجاور ناحیه حذف شده در ژن *icsA* انجام گردید.

مقایسه ناحیه توالی یابی شده با اطلاعات موجود در بانک زنی نشان داد که 1751 جفت باز از ژن *icsA* از سویه وحشی شیگلا *دیسانتری* تیپ 1 در پلاسمید نوترکیب pSD132Δ*icsA* دچار گسستگی (حذف) شده است.



شکل 8. الکتروفورز محصول همسانه سازی ژن Δ*icsA* در ناقل انتحاری pSD132 و محصول PCR تشخیص ژن جهش یافته Δ*icsA* بر روی ناقل pSD132Δ*icsA* ژل آگاروز 1/8درصد، 1) محصول PCR تشخیص ژن جهش یافته Δ*icsA* در ناقل انتحاری pSD132Δ*icsA* (قطعه 1484 bp) 2) نشانگر وزن مولکولی 1Kb DNA (آلمان، فرمنتاز)، 3) قطعه 6670 جفت بازی نشاندهنده صحت همسانه سازی قطعه 1484 جفت بازی ژن Δ*icsA* می‌باشد،

بحث

تا کنون تلاش‌های بسیار زیادی جهت تولید یک واکسن ایمن و موثر برعلیه عامل بیماری اسهال خونی در جهان صورت گرفته است. ولی هیچ کدام از آنها به خاطر دلایلی مانند ایمن نبودن در کودکان، عدم تحریک مناسب ایمنی مخاطی، پیچیده بودن روند تولید واکسن و گران بودن، مجوز استفاده در حجم وسیع و عمومی را دریافت نکرده‌اند و گاهی مصرف آنها به یک کشور خاص و در گروه سنی خاصی محدود شده است. یکی از مهم‌ترین راهکارهای تولید واکسن علیه شیگلوز تولید واکسن‌های زنده مهاجم و تخفیف حدت یافته می‌باشد زیرا این واکسن‌ها علاوه بر داشتن مصرف خوراکی، توانایی بالایی را در تحریک سیستم ایمنی مخاطی و فعال کردن شدید سیستم ایمنی دارا هستند(21، 22، 24).

میترت و همکاران در سال 1984 سویه جهش یافته T32-ISTRATI را با استفاده از تکنیک پاساژ متوالی در شیگلا *فلکسنری* 2a ایجاد نمودند. این کاندید واکسنی پس از 32 مرتبه کشت متوالی در محیط نوترینت آگار جداسازی و از نظر ایجاد ورم ملتحمه در چشم خوکچه هندی (تست Sereny) منفی گزارش گردید(25).

ونکاتسن و همکاران در سال 1990 سویه کاندید واکسنی T32-ISTRATI را از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی ارزیابی نمودند. ارزیابی‌ها حذف سه لکوس *icsA*، *invA* و*IpaABCD* را در پلاسمید تهاجمی شیگلا نشان داد. هم‌چنین کاندید واکسنی شیگلا *فلکسنری* 2a وابسته به استرپتومایسین (SmD) نیز با روشی مشابه که در ساخت T32-ISTRATI به کار رفت، در سال 1972 ایجاد شد. تکنیک پاساژ متوالی معایبی هم‌چون عدم اختصاصیت، برگشت پذیری به نوع وحشی و ناپایداری ژنتیکی را دارد، بنابراین به منظور ایجاد جهش اختصاصی و هدفمند در باکتری مناسب نمی‌باشد(26).

امروزه با پیشرفت روش‌های مهندسی ژنتیک تکنیک های مختلفی به منظور ایجاد جهش و گسستگی در ژن‌ها استفاده می گردد که بیشترین آنها بر پایه غیر فعال کردن ژن‌ها از طریق دخول کاست ژنی و یا حذف ژن قرار گرفته است. یکی از مهم‌ترین روش‌ها، استفاده از پلاسمیدهای انتحاری می‌باشد. *یوشیکاوا* و همکاران در سال 1995 با ایجاد دو جهش در ژن‌های *icsA* و *thyA* توانستند سویه تخفیف حدت یافته شیگلا *فلکسنری* 2a را با استفاده از ترانسپوزون *Tn10* و فاژ P1 ایجاد کنند. عدم ایجاد التهاب و حفاظت در برابر شیگلا از نتایج آن در مدل حیوانی خوکچه هندی بود(27). سویه کاندید واکسنی CVD1203 (Δ*icsA*, Δ*aroA*) توسط *نورجیا* و همکاران در سال 1994 با استفاده از پلاسمیدهای خودکشان pFJ201، pKTN701

ساخته شد(28). نتایج بالینی این سویه واکسنی در خوکچه هندی و انسان در دوز متوسط (در حدود 10^6 CFU) نشان از تحمل‌پذیری بالای آن داشت اما در دوزهای بالاتر (در حدود 10^8 CFU تا 10^9) بخشی از دریافت کنندگان به سویه واکسنی واکنش منفی نشان دادند(16). بنابراین ایجاد تخفیف حدت بیشتر از طریق غیر فعال نمودن مسیرهای بیوسنتزی، متابولیکی و نیز توکسینی مورد توجه قرار گرفت. هم‌چنین علاوه بر CVD1203، CVD1204 (Δ*guaBA*)، CVD1205 (Δ*icsA*, Δ*guaBA*)، CVD 1207 (Δ*set*, Δ*icsA*, Δ*guaBA*) و CVD1208 (Δ*sen*, Δ*guaBA*, Δ*icsA* Δ*set*, Δ*sen*, ΔΔ*guaBA*)، بر پایه استفاده از پلاسمیدهای خودکشان و پدیده تبادل آللی طراحی و ساخته شد. نتایج بالینی سویه‌های تولید شده نشان دادند که حذف و غیر فعال نمودن این ژن‌ها تحمل‌پذیری و ایمنی‌زایی بالایی را در انسان سبب می‌گردد(16). *ونکاتسن* و همکاران در سال 2002 با ایجاد جهش در دو ژن *icsA* و *stxA* سویه کاندید واکسنی WRSd1 را ایجاد نمودند. در این تحقیق از پلاسمید خودکشان pCVD442 و محیط حاوی کلرات پتاسیم به منظور حذف ژن های *icsA* و *stx* استفاده گردید(14).

سدورژ و همکاران در سال 2008 سویه کاندید واکسنی SC599 را از سویه *شیگلا دیسانتری* تیپ 1 حامل جهش حذفی در ژن‌های *icsA*، *entF* (ژن مسئول بیوسنتز انتروکلین)، *fepA* (گیرنده دریافت کننده انتروکلین) و *fes* (مسئول رها سازی از Fe^{3+} از انتروکلین) و *stx* ساختند. در این تحقیق از پلاسمید از خود بین برنده pJM703/1 و کاست بیانی *npt1-sacB-sacR* استفاده شد. نتایج بالینی این سویه در داوطلبان انسانی ایمنی محافظتی مناسبی را از خود نشان داد(29).

مهندسی ژنتیک معکوس روش قدرتمندی برای شناسایی کارکرد ژن ها و ایجاد جهش در آنها می‌باشد به شرطی که با ایجاد جهش و یا غیر فعال سازی ژن مورد نظر، تاثیرات آن بر روی میکروارگانیسم قابل ارزیابی و سنجش باشد. در تحقیقاتی که در آن ایجاد جهش با تکیه بر روش‌های تبادل آللی انجام پذیرفته است از وکتورهای خود کشان بهره گرفته شده است. اگر چه این تکنیک در بسیاری از باکتری‌ها کارایی دارد اما بسیار پیچیده می‌باشد. عدم تکثیر حامل خودکشان در برخی از سویه‌ها، فرکانس پایین نوترکیبی در حالت double crossover و جداسازی سویه‌های جهش یافته مورد نظر که سهم بسیار کمی از سویه‌های تراریخت شده را تشکیل می‌دهند از مشکلات این روش‌ها می‌باشد. اما به منظور حل کردن مشکل فوق در برخی از تحقیقات از نشانگرهای شمارشگر انتخاب شونده (Counterselectble) مانند ژن های *SacB*، *rpsL* و *thyA* به کار گرفته شده است(13، 20). در تحقیق حاضر با توجه به مزایای ناقل pSD132، به منظور ساخت سازه pSD132Δ*icsA* مورد استفاده قرار گرفت. این پلاسمید به دلیل حضور ژن گزارشگر *SacB*، وجود ناحیه *mob* (از پلاسمید RP4) و داشتن منشا همانند سازی از پلاسمید R6K کاندید مناسبی به عنوان بک ناقل انتحاری در ایجاد حذف ژنی با تکیه بر پدیده تبادل آللی می‌باشد. معایب استفاده از این تکنیک را می‌توان در استفاده از پلاسمیدهای متعدد، هزینه بالا و زمان زیاد، انتخاب قطعه با طول بالا با ناحیه هدف و نیز احتمال از بین نرفتن پلاسمید خودکشان در میزبان مورد نظر بر شمرد. اما با توجه به حذف هدفمند ژن مورد نظر در سویه وحشی نسبت به روش‌های اولیه‌ای مانند پاساژ متوالی برتری قابل توجهی را داراست. امروزه در دوران پس از ژنومیکس، با مشخص شدن توالی ژنومی موجودات پروکاریوت مانند *اشرشیا کلی*، *سالمونلا* و *شیگلا* و غیره استفاده از این تکنیک‌ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است.

نتیجه گیری

امروزه کارایی استفاده از پلاسمیدهای انتحاری علیرغم معایب اشاره شده در بسیاری از باکتری‌های حدت زا مانند شیگلا اثبات شده است.

در مجموع، سازه pSD132Δ*icsA* با داشتن تقریبی 600 جفت باز توالی مشابه با نواحی از ژن هدف (*icsA*) در هر طرف خود، یک پلاسمید انتحاری مناسب

برای ایجاد جهش در پلاسمید تهاجمی گونه‌های شیگلا می‌باشد. از آنجایی که این پلاسمید به دلیل عدم جای گذاری توالی‌های نشانه‌ای (scars sequence) از خود در ژنوم باکتری می‌تواند از آن به منظور ایجاد جهش‌های ترکیبی نیز استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مهندس غفاری، اشرافی، خرمالی در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و مهندس زند در دانشکده علوم پایه دانشگاه جامع امام حسین (ع) و هم‌چنین از اعضای مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی به خاطر همکاریشان صمیمانه تشکر می گردد.

منابع

1. Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, et al. Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. Bull World Health Organ. 1999;77(8):651-66.
2. Banish LD, Sims R, Sack D, Montali RJ, Phillips L, Bush M. Prevalence of shigellosis and other enteric pathogens in a zoologic collection of primates. J Am Vet Med Assoc. 1993; 203(1):126-32.
3. Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive Escherichia coli and Shigella spp. Infect Immun. 2004; 2(9): 080-8.
4. Girard MP, Steele D, Chaignat CL, Kieny MP. A review of vaccine research and development: human enteric infections. Vaccine. 2006;24(15):2732-50.
5. Bennish ML. Potentially lethal complications of shigellosis. Rev Infect Dis. 1991;13 Suppl 4: 319-24.
6. 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(23):9317-21.
7. 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(5):3271-85.
8. 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(10):3867-71.
9. 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(1):353-9.
10. Suzuki T, Sasakawa C. Molecular basis of the intracellular spreading of Shigella. Infect Immun. 2001;69(10):5959-66.
11. Suzuki T, Saga S, Sasakawa C. Functional analysis of Shigella VirG domains essential for interaction with vinculin and actin-based motility. J Biol Chem. 1996;271(36):21878-85.
12. Ranallo RT, Barnoy S, Thakkar S, Urick T, Venkatesan MM. Developing live Shigella vaccines using lambda Red recombineering. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006; 47(3): 462-9.
13. Reyrat JM, Pelicic V, Gicquel B, Rappuoli R. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. Infect Immun. 1998; 66(9):4011-7.
14. 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(6):2950-8.
15. Alexander WA, Hartman AB, Oaks EV, Venkatesan MM. Construction and characterization of virG (icsA)-deleted Escherichia coli K12-Shigella flexneri hybrid vaccine strains. Vaccine. 1996;14(11):1053-61.
16. Kotloff KL, Pasetti MF, Barry EM, Nataro JP, Wasserman SS, Sztein MB, et al. Deletion in the Shigella enterotoxin genes further attenuates Shigella flexneri 2a bearing guanine auxotrophy in a phase 1 trial of CVD 1204 and CVD 1208. J Infect Dis. 2004;190(10):1745-54.

17. Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination. Annu Rev Genet. 2002;36:361-88.
18. Philippe N, Alcaraz JP, Coursange E, Geiselmann J, Schneider D. Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. Plasmid. 2004;51(3):246-55.
19. Bej AK, Perlin MH, Atlas RM. Model suicide vector for containment of genetically engineered microorganisms. Appl Environ Microbiol. 1988;54(10):2472-7.
20. Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP, Stewart AF. A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli. Nat Genet. 1998; 20(2):123-8.
21. Jennison AV, Verma NK. Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development. FEMS Microbiol Rev. 2004; 28(1): 43-58.
22. Fries LF, Montemarano AD, Mallett CP, Taylor DN, Hale TL, Lowell GH. Safety and immunogenicity of a proteosome-Shigella flexneri 2a lipopolysaccharide vaccine administered intranasally to healthy adults. Infect Immun. 2001; 69(7):4545-53.
23. Talukder KA, Dutta DK, Safa A, Ansaruzzaman M, Hassan F, Alam K, et al. Altering trends in the dominance of Shigella flexneri serotypes and emergence of serologically atypical S. flexneri strains in Dhaka, Bangladesh. J Clin Microbiol. 2001; 39(10): 3757-9.
24. Dean D. A plasmid cloning vector for the direct selection of strains carrying recombinant plasmids. Gene. 1981; 15(1):99-102.
25. Meitert T, Pencu E, Ciudin L, Tonciu M. Vaccine strain Sh. flexneri T32-Istrati. Studies in animals and in volunteers. Antidysentery immunoprophylaxis and immunotherapy by live vaccine Vadizen (Sh. flexneri T32-Istrati). Arch Roum Pathol Exp Microbiol. 1984;43(3-4):251-78.
26. Venkatesan M, Fernandez-Prada C, Buysse JM, Formal SB, Hale TL. Virulence phenotype and genetic characteristics of the T32-ISTRATI Shigella flexneri 2a vaccine strain. Vaccine. 1991; 9(5):358-63.
27. Yoshikawa M, Sasakawa C, Okada N, Takasaka M, Nakayama M, Yoshikawa Y, et al. Construction and evaluation of a virG thyA double mutant of Shigella flexneri 2a as a candidate live-attenuated oral vaccine. Vaccine. 1995; 13(15): 1436-40.
28. 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(11):5168-72.
29. 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(7):978-87.