

طراحی و ایجاد موتاسیون در ژن *wbk A* بروسلا آبور توس S19 به روش Overlap Extension PCR

سولماز ناصرلی^۱، تقی زهرایی صالحی^۱، بهار نیری فسایی^{۱*}، علیرضا سعیدی نیا^۲، ایرج اشرفی تمامی^۱

(۱) گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(۲) گروه فن آوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران-ایران

(دریافت مقاله: ۲۹ فروردین ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۱۵ تیر ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: ایجاد موتاسیون در جایگاه اختصاصی می‌تواند یکی از روش‌های کارآمد جهت بررسی ویژگی و خواص تنظیمی ژن‌های گوناگون باشد. بروسلاز از مهم‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام است که منجر به بروز ضررهای اقتصادی فراوانی می‌شود. بنابراین شناسایی عوامل پاتوژن و ایمنی‌زا در جنس بروسلا به عنوان راهگشای جهت کنترل این معضل بهداشتی مطرح می‌باشد. هدف: با توجه به اهمیت جهش هدفدار در شناسایی ساختار ژنوم و وجود روش‌های متعدد جهت دست‌یابی به این هدف، روش Overlap Extension PCR به عنوان یک تکنیک اصلاح شده جهت حذف و جایگزینی ژن هدف معرفی می‌شود. روش کار: جهت انجام این تحقیق، با انجام دو مرحله PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، قطعات بالادست و پایین دست ژن هدف از ژنوم باکتری و کاست مقاومت آنتی بیوتیکی از پلاسمید pET28(+), تکثیر یافته و به یکدیگر اتصال یافتند. قطعه حاصله با استفاده از آنزیم‌های محدودالتر که توالی آنها در انتهای ۵' پرایمرهای خارجی قرار داده شده است، در جایگاه اختصاصی از پلاسمید pBluescriptII SK(-) همسانه سازی شده و پس از حصول اطمینان از عدم ایجاد جهش خودبخودی در حین مراحل PCR، با استفاده از روش الکتروپوریشن به داخل ژنوم بروسلا آبور توس انتقال یافت. نتایج: همسانه سازی محصول PCR اتصالی که بدون بروز تغییر در توالی نوکلئوتیدی حاصل شده بود، داخل پلاسمید pBluescriptII SK(-) انجام شد و پس از انتقال الکتریکی پلاسمید به ژنوم بروسلا آبور توس، طی عمل ریکامینیشن باعث جهش در ژن مورد نظر گردید. نتیجه گیری نهایی: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که Overlap Extension PCR یک تکنیک بهینه و اصلاح شده به منظور ایجاد جهش در ساختار ژنوم باکتری بوده و به راحتی می‌تواند در خانواده بروسلا استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: بروسلا آبور توس، جهش، Overlap Extension PCR

مقدمه

بروسلاز در گاو یک بیماری زئونوز با شیوع جهانی می‌باشد که با سقط جنین و کاهش قدرت باروری خود را نشان می‌دهد (۱۹). عامل بیماری که باکتری بروسلا آبور توس می‌باشد، توانایی رشد و تکثیر در سلول‌های سیستم رتیکلواندوتلیال را دارد و با جایگزین شدن داخل سلول‌ها در تمام بدن میزبان گسترش می‌یابد (۱۳). جهت مبارزه علیه این بیماری، تا کنون واکسن‌های متعددی از سویه‌های زنده یا کشته بروسلا آبور توس، بروسلا ملی تنسیس و حتی بروسلا سوئیس جهت ایمن سازی گاو مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴). از بین واکسن‌های موجود، واکسن تهیه شده از سویه ۱۹ بروسلا آبور توس (S۱۹) یکی از واکسن‌های انتخابی ایمن سازی علیه بروسلاز گاوی بوده که در گذشته با بالاترین میزان مصرف در سطح جهان، در مبارزه علیه بیماری مؤثر بوده است. در خصوص این واکسن گفته می‌شود با وجود مطالعات گسترده، مکانیسم تخفیف حدت یافتن این سویه مشخص نشده است (۱۸). بررسی عملکرد و ارزیابی میزان حدت هر یک از ژن‌ها می‌تواند نقش مهمی در شناسایی ساختار ژنومی سویه، بررسی حدت سویه و تحریک سیستم ایمنی داشته باشد، که یکی از مهمترین روش‌های دست‌یابی به این هدف جایگزین کردن ژن مورد نظر با کاست مقاومت

آنتی بیوتیکی و حذف آن ژن می‌باشد (۱۲). ژن *WbkA*، از ژن‌های مؤثر در سنتز زنجیره O پلی ساکارییدی دیواره سلولی باکتری و نیز مؤثر در حدت بوده که در این مطالعه به عنوان هدف موتاسیون مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اهمیت روزافزون ایجاد موتاسیون در جایگاه اختصاصی و حذف هدف دار ژن‌ها، شناسایی روشی که این امر را با سهولت بیشتر محقق سازد از اهمیت بالایی برخوردار است (۶). از این رو، در این تحقیق از روش Overlap Extension PCR به منظور حذف ژن هدف استفاده شده است تا کارآمد و مفید بودن این روش مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش کار

واکنش PCR اولیه: قسمت بالادست و پایین دست ژن *WbkA* به ترتیب با استفاده از پرایمرهای ۱،۲ و ۳،۴ تکثیر یافتند و همچنین کاست مقاومت به کانامایسین (Kan^R) از پلاسمید pET28 a (+) توسط پرایمرهای ۵،۶ از دیاد یافت (جدول ۱). حجم مخلوط نهایی هر واکنش به ۵۰ μL رسید که شامل ۱۰ ng DNA ژنومی، ۵ μL بافر Pfu ۱۰X، ۱ μL MgSO₄، ۴۰ μL از dNTPs (۱۰ mM)، ۰/۵ μM هر یک از پرایمرها و ۱/۵U آنزیم Pfu DNA Polymerase



از پلاسمید نوترکیب اضافه شده، مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ گذاشته شد و سپس به مدت ۹۰ ثانیه در دمای 42°C به آن شوک گرمایی داده شد و بعد از آن با فاصله مجدداً برای ۲ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. سپس $900\ \mu\text{L}$ محیط LB اضافه شد و پس از یک ساعت بر روی شیکر در دمای 37°C و انجام سانتریفیوژ، در محیط LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین $50\ \mu\text{g/mL}$ IPTG، $(0/M1)$ و $X\text{-gal}$ ($\text{mg/mL} \times 0$) کشت داده شد و در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید (۲۳).

تعیین توالی: برای انتخاب کلون‌های حاوی پلاسمید نوترکیب، کلونی‌های سفید و آبی مورد بررسی قرار گرفتند. یک کلونی سفید و یک کلونی آبی در $10\ \text{mL}$ محیط LB براث حاوی $50\ \mu\text{g/mL}$ آمپی سیلین کشت داده و بصورت شبانه در انکوباتور شیکردار در دمای 37°C قرار داده شدند و سپس DNA پلاسمید استخراج شد (Plasmid Extraction Kit, MBST, Iran). برای تأیید همسانه سازی، از روش PCR با پرایمرهای خارجی ۴ و ۱ و برش آنزیمی همانند مرحله قبل استفاده شد. و نیز برای تأیید نهایی، پلاسمید استخراج شده از کلونی سفید به منظور تعیین توالی به شرکت ژن فن آوران ارسال شد و برای این کار از پرایمرهای T۳، FR-M۱۳ استفاده شد.

الکتروپوریشن: جهت انتقال الکتریکی، باکتری مستعد بروسلا به روش Electro competent تهیه شد (۷). سپس $10\ \text{ng}$ DNA پلاسمید به $50\ \mu\text{L}$ از سلول مستعد اضافه شد و انتقال پلاسمید نوترکیب به باکتری مستعد با استفاده از دستگاه الکتروپوریشن Bio-Rad و برنامه $Ec2$ انجام گرفت. باکتری‌ها به محیط بروسلا آگار حاوی کانامایسین $50\ \mu\text{g/mL}$ منتقل شده و برای مدت ۴ روز در انکوباتور 37°C قرار داده شدند.

نتایج

قطعات مورد نظر از DNA ژنومی و پلاسمید (+) pET۲۸ a به روش PCR تکثیر یافتند و نیز بررسی نتیجه تکثیر قطعه حاصل از PCR اتصال با آنزیم pfu و الکتروفورز این قطعه سایزی معادل $1846\ \text{bp}$ را نشان می‌دهد که برابر با وزن قطعه مورد انتظار می‌باشد (تصویر ۲الف). جهت بررسی نتیجه همسانه سازی محصول استخراج و خالص شده PCR اتصال به داخل پلاسمید pBluescriptII SK(-)، پرگنه‌های سفید و آبی رنگ که در محیط LB آگار حاوی آنتی بیوتیک اختصاصی، معرف $X\text{-gal}$ و IPTG رشد یافته بودند مورد بررسی قرار گرفتند. الکتروفورز DNA پلاسمیدی حاصل از باکتری‌های پرگنه سفید بیانگر موفقیت آمیز بودن همسانه سازی قطعه مورد نظر بود. همچنین با برش پلاسمید pBluescriptII SK(-) نوترکیب بوسیله آنزیم‌های XhoI، XbaI به علت وجود دو جایگاه برش در وکتور که در دو سوی قطعه حضور دارند، قطعه مورد نظر از وکتور خارج شد و در ژل الکتروفورز یک باند مجزا تشکیل داد. همچنین هضم تک آنزیمی توسط آنزیم‌های XhoI، XbaI انجام شد که در نتیجه پلاسمید نوترکیب

(Fermentase, Latvia) بود. سپس نمونه‌ها مطابق برنامه سیکل حرارتی 95°C به مدت ۴ دقیقه جهت واسرشت اولیه و تکرار 35 سیکل بصورت 95°C به مدت ۱ دقیقه، 55°C ، 53°C ، 52°C برای ۱ دقیقه به ترتیب برای قطعات بالادست، پایین دست و کاست مقاومت آنتی بیوتیکی، 72°C به مدت ۲ دقیقه و پس از اتمام سیکل‌ها ۱۰ دقیقه در دمای 72°C به منظور تکثیر نهایی در دستگاه ترموسایکلر (Techne, UK) قرار داده شدند. هر یک از محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE منتقل شدند و پس از انجام الکتروفورز، استخراج از ژل هر یک از محصولات بر طبق پروتکل کیت (Gel Extraction Kit, MBST, Iran) انجام شد.

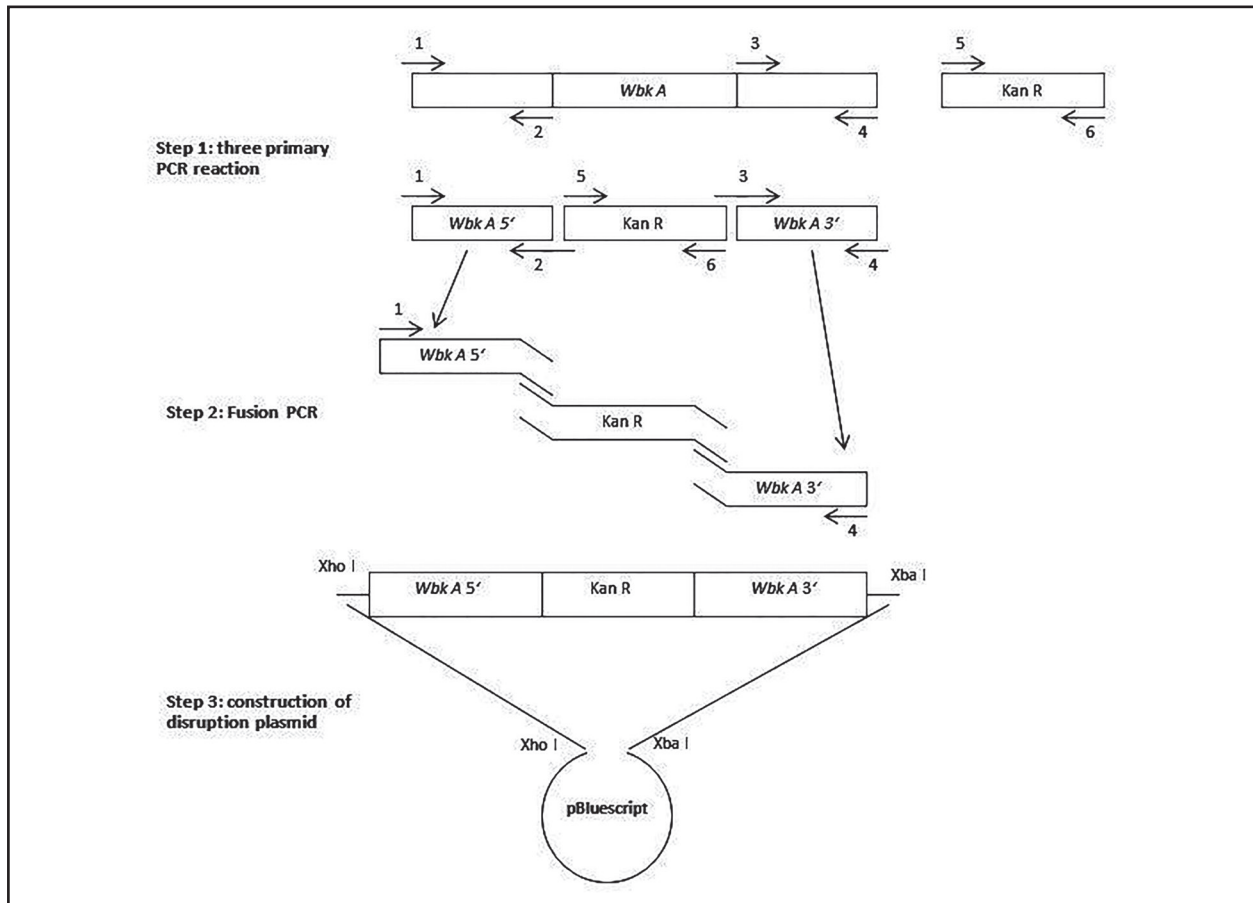
واکنش PCR اتصالی: همانطور که در تصویر نمایش داده شده است (تصویر ۱)، پرایمر Reverse جهت تکثیر قطعه بالادست و نیز پرایمر Forward جهت تکثیر قطعه پایین دست، واجد همپوشانی با توالی قطعه مقاومت آنتی بیوتیکی هستند. این نوع واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از ۳ محصول واکنش پلیمرز مرحله قبل که از هر کدام به میزان $1\ \text{ng}$ و نیز پرایمرهای ۴ و ۱ انجام شد که این ۲ پرایمر در انتهای ۵ خود واجد محل برش آنزیم‌های محدودالتر می‌باشند. شرایط انجام واکنش همانند مرحله قبل می‌باشد با این تفاوت که دمای مرحله اتصال به 60°C و نیز زمان مرحله گسترش به ۳ دقیقه افزایش یافتند. سپس محصول این مرحله از واکنش PCR اتصالی، بر روی ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE منتقل شده و پس از انجام الکتروفورز، استخراج از ژل محصول به منظور انجام همسانه سازی بر طبق پروتکل کیت (Gel Extraction Kit, MBST, Iran) انجام شد. **همسانه سازی:** به منظور انجام تکثیر به دور از موتاسیون قطعه حاصل از مرحله واکنش PCR اتصالی، از این روش استفاده می‌شود. جهت انجام هضم آنزیمی با توجه به توالی قطعه حاصل و پلاسمید pBluescriptII SK(-) از آنزیم‌های محدودالتر XhoI، XbaI استفاده شد. به این منظور، مخلوط‌های $20\ \mu\text{L}$ که حاوی $0.5\ \mu\text{g}$ از محصول PCR و $1\ \mu\text{g}$ از پلاسمید، $2\ \mu\text{L}$ از بافر $X10$ و $1/5\ \mu\text{L}$ از هر کدام از آنزیم‌ها با غلظت $10\ \text{u}/\mu\text{L}$ (Fermentas, Latvia) تهیه شدند و برای ۱۶ ساعت در دمای 15°C قرار داده شدند. سپس محصولات هضم آنزیمی توسط الکتروفورز بررسی گردید. جهت انجام مرحله Ligation، $100\ \text{ng}$ DNA خطی پلاسمید pBluescriptII SK(-)، $300\ \text{ng}$ محصول خطی شده PCR، $2\ \mu\text{L}$ بافر $X10$ و $1\ \text{u}$ آنزیم T۴ DNA Ligase (Fermentas, Latvia) با آب مقطر استریل به حجم $20\ \mu\text{L}$ رسانده شدند. سپس به مدت ۹۰ دقیقه در دمای 22°C قرار داده شد تا عمل چسباندن توسط DNA لیگاز کامل شود.

ترانسفورماسیون: به منظور انتقال پلاسمید به میزبان مناسب، ابتدا از باکتری *E. coli* سلول‌های مستعد به روش کلرید کلسیم با محلول $0.1\ \text{M}$ CaCl_2 تهیه شد (۲۳) و سپس مراحل انجام ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب انجام گرفت. بدین صورت که به $100\ \mu\text{L}$ از سلول مستعد $100\ \mu\text{L}$



جدول ۱. توالی آغازگرهای هر منطقه جهت انجام PCR و آنزیم‌های برشگر لازم به منظور همسانه سازی. توالی‌های نشان دار شده در پرایمرهای ۱ و ۴ مناطق مربوط به سایت برش آنزیم‌های *xbaI*، *xhoI* می‌باشند. توالی‌های نشان دار شده در پرایمرهای ۲ و ۳ مناطق واجد همپوشانی با ژنوم بروسلا آبور تویس S19 می‌باشند.

Primers	Sequence	Restriction Enzyme
۱. Up – F	۵' - CGCTCGAGAATCGACTGGAGGCTGTACAAG ۳'	Xho I
۲. Up – R	۵' - GTTCCCGTTGAATATGGCTCATTCTTCTATGAAGCTAATTGTTTGATC ۳'	
۳. Down – F	۵' - CATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAAATTACTTGCGAATATCGGTC ۳'	
۴. Down – R	۵' - GCTCTAGACTCCTTTGTAATCGCTCATCTG ۳'	Xba I
۵. Kan – F	۵' - ATGAGCCATATTCAACGGGAAAC ۳'	
۶. Kan – R	۵' - TTAGAAAACTCATCGAGCATCAAATG ۳'	



تصویر ۱. طرح شماتیک واکنش Overlap Extension PCR و واکنش همسانه سازی در پلاسمید pBluescript.

بصورت خطی در آمد (تصویر ۲ ب). در نهایت صحت همسانه سازی با تعیین توالی قطعه تأیید شد.

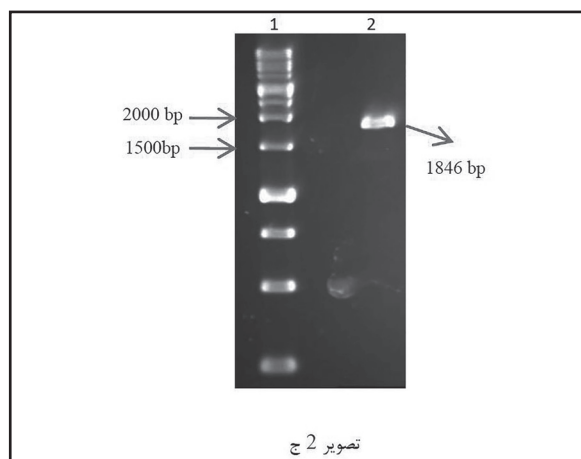
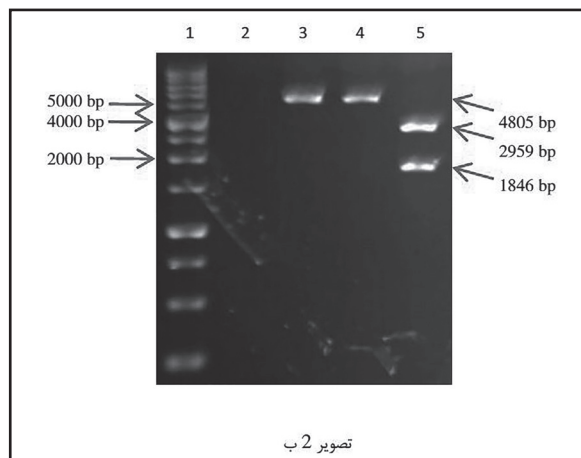
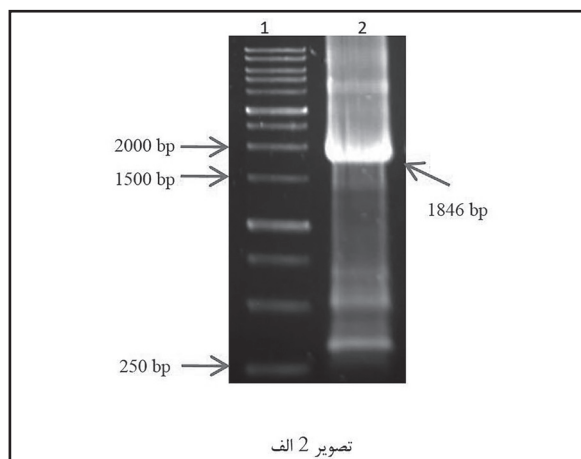
بحث

بروسلوز مشکلی جهانی است. به استثنای تعداد محدودی از کشورهای جهان که عاری از بیماری بوده یا موفق به ریشه کنی شده‌اند، اکثریت کشورها به این بیماری آلوده‌اند (۲۱). جهت کنترل بروسلوز آزمایش، کشتار حیوانات آلوده و واکسیناسیون از مهمترین برنامه‌ها می‌باشند لذا جلوگیری از بروسلوز انسانی وابسته به کنترل بیماری در حیوانات است (۱۷). واکنش‌هایی برای پیشگیری از بروسلوز حیوانی که سوبیه‌های زنده تخفیف

هر کدام از کلونی‌های رشد یافته بر روی محیط بروسلا آگار حاوی کانامایسین بعد از الکتروپوریشن، روی محیط کشت مجزایی رشد یافتند و همگی بعد از استخراج DNA، توسط پرایمرهای مربوط به قطعات بالادست، پایین دست و کاست کانامایسین بررسی شدند و واجد مناطق ۵۲۱ bp، ۵۱۳ bp و ۸۱۲ bp بودند. برای اطمینان از جایگزینی صحیح این قطعه نسبت به همولوگ خود در بروسلا آبور تویس S19، PCR توسط پرایمرهای اختصاصی ۱ و ۴ انجام گرفت که نشان دهنده جایجایی صحیح قطعه ۱۸۴۶ bp با قطعه همولوگ خود در بروسلا آبور تویس S19 بود (تصویر



حدت یافته‌اند در دسترس است ولی این واکنش‌ها معایبی دارند که استفاده از آنها دام را با مشکل مواجه می‌کند (۱۶). عدم انگیزش پاسخ سرولوژیکی پایدار، سقط جنین در حیوانات باردار، تداخل در تشخیص بیماری و خطر آلوده شدن انسان از مهمترین موارد می‌باشند به علاوه جهت مقابله با برسولوز انسانی نیز هنوز واکنش تأیید شده ای وجود ندارد (۴). لذا با حذف ژن‌های دخیل در حدت، ایمنی زایی و نیز ژن‌هایی که مسئول تداخل با واکنش‌های تشخیصی هستند می‌توان در زمینه بهینه سازی واکنش‌های موجود تلاش کرد. بنابراین شناسایی آنتی ژن‌های حفاظت بخش بروسلا برای تولید واکنش‌های ساب سلولار ضروری می‌باشد (۲۰). شناسایی عملکرد ژن‌های گوناگون ساختار لیپوپلی ساکارید بروسلا، که به عنوان یکی از ساختارهای حدت این جنس شناخته می‌شود از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۵). حذف ژن‌های گوناگون و بررسی بازتاب این حذف، به شناسایی نقش ژن‌ها کمک به سزایی خواهد کرد. به منظور حذف هدفدار ژن‌ها با توجه به تنوع روش‌های موتاسیون، نیاز به یک روش استاندارد معتبر و صحیح می‌باشد که در این تحقیق روش *Overlap Extension* به عنوان یک تکنیک بهینه جهت ایجاد موتاسیون در جنس بروسلا بکار گرفته شد که قابلیت استفاده در سایر میکروارگانیسم‌ها را نیز دارد (۱). این تکنیک توسط *Russell Higuchi* و همکاران در سال ۱۹۸۸ به منظور ایجاد اختلال در ساختار ژنوم باکتری‌ها معرفی شد (۸) و سپس توسط *Horton RM* و همکاران در سال‌های ۱۹۹۰ و ۱۹۹۵ با هدف ایجاد موتاسیون در جایگاه اختصاصی بکار گرفته شد که با موفقیت زیادی همراه بود (۹، ۱۰). امروزه نیز این روش به عنوان یک تکنیک شناخته شده به منظور ایجاد قطعه ای با توالی مورد نظر مورد استفاده محققین قرار می‌گیرد (۲، ۳، ۱۱). *Saeedinia* و همکاران در سال ۲۰۱۳ با استفاده از این روش اقدام به حذف ژن پروزومین سنتتاز (*per*) در بروسلا ملی تنسیس *Rev1* کرده و با توجه به موفقیت آمیز بودن نتایج حاصل از حذف ژن، سویه موتان یافته را به عنوان یک سویه کاندید واکنش معرفی کردند (۲۲) همچنین *Nahid* و همکاران در سال ۲۰۱۱ ژن کد کننده آنزیم ایزوسیترات لیاز (*aceA*) در باکتری بروسلا آبوروس را با استفاده از روش *Overlap Extension PCR* غیر فعال کرده و این روش را تلفیقی از دو تکنیک *PCR* و همسانه سازی با کارایی و حساسیت بالا دانسته‌اند (۱۶). *pET28a(+)* یک وکتور بیانی می‌باشد که واجد کاست مقاومت آنتی بیوتیک کانامایسین است، پرایمرهای طراحی شده جهت تکثیر قطعات بالادست و پایین دست ژن هدف دارای ۲۰ نوکلئوتید همولوژی با ابتدا و انتهای ژن مربوط به کاست مقاومت آنتی بیوتیکی از پلاسمید *pET28a(+)* بوده و به جهت دارا بودن این همولوژی در واکنش *PCR* نهایی به یکدیگر اتصال می‌یابند. قطعه حاصله در پلاسمید *pBluescriptII(-)* کلون شده که یک وکتور مناسب به منظور کلونینگ، تعیین توالی، موتاسیون در جایگاه اختصاصی و ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی می‌باشد که بعد از ورود



تصویر ۲. نتایج واکنش‌های *PCR* و هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های محدود کننده. تصویر ۲ الف، محصول واکنش *PCR* اتصال با آنزیم *pfu* (۱۸۴۶ bp) روی ژل آگارز ۱٪، چاهک ۱ مارکر *DNA* و چاهک ۲ محصول واکنش *PCR* اتصال. تصویر ۲ ب، تصویر محصول همسانه سازی روی ژل آگارز ۱٪، چاهک ۱ مارکر *DNA*، چاهک ۲ کنترل منفی، چاهک ۳ و ۴ پلاسمید *pBluescript* که به ترتیب بوسیله آنزیم‌های *XhoI*، *XbaI* برش خورده است، چاهک ۵ پلاسمید *pBluescript* نوترکیب که بطور همزمان بوسیله ۲ آنزیم *XhoI*، *XbaI* برش خورده است و پلاسمید *pBluescript* به وزن ۲۹۵۶ bp و قطعه حاصل از واکنش *PCR* اتصال به وزن ۱۸۴۶ bp جدا شده‌اند. تصویر ۲ ج، محصول *PCR* ناشی از پرایمرهای ۱ و ۴ بر روی *DNA* استخراج شده از باکتری الکتروپوریت شده و رشد یافته بر روی محیط اختصاصی آنتی بیوتیک دار، چاهک ۱ مارکر *DNA* و چاهک ۲ محصول واکنش *PCR* تأییدی.



References

1. Anton, V.B., Matsumura, I. (2010) Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*. 48: 463-465.
2. Bikard, D., Jiang, W., Samai, P. (2013) Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res.* 41: 7429-7437.
3. Brian, M.F., Bitar, A.P. (2011) The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is regulated by pH. *J Bacteriol.* 193: 5090-5097.
4. Briones, G. (2001) *Brucella abortus* cyclic b-1, 2-glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in HeLa cells. *Infect Immun.* 69: 4528-4535.
5. Chou, C., Olszewski, N.E. (2004) Generation of random, in-frame mutations by TN1000-mediated mutagenesis. *J Genet Mol Biol.* 2: 137-142.
6. Denamur, E., Matic, I. (2006) Evolution of mutation rates in bacteria. *Mol Microbial.* 60: 820-7.
7. Eskra, L., Canavessi, A. (2001) *Brucella abortus* Genes Identified following Constitutive Growth and Macrophage Infection. *Infect Immun.* 69: 7736-7742.
8. Higuchi, R., Krummel, B. (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16: 7351-67.
9. Horton, R.M. (1995) PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes. *Mol Biotechnol.* 3: 93-9.
10. Horton, R.M., Cai, Z.L. (1990) Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques.* 8: 528-35.
11. Jiang, W., Bikard, D. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using crisPr-cas systems. *Nat Biotechnol.* 31: 233-9.
12. Kahl-McDonagh, M.M. (2006) Evaluation of protection afforded by *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* unmarked deletion mutants exhibiting different rates of clearance in BALB/c mice. *Infect Immun.* 74: 4048-4057.
13. Mariana, N.X., Tatiane, A.P. (2010) Pathogenesis of *Brucella* spp. *Vet Sci J.* 4: 109-118.
14. Mohamed, N.S., Stephen, M.B., Sriranganathan, N. (2008) *Brucella*: A pathogen without classic virulence genes. *Vet Microbiol.* 129: 1-14.
15. Monreal, D., Grillo, M.J. (2003) Characterization of *Brucella abortus* O-Polysaccharide and core lipopolysaccharide mutants and demonstration that a complete core is required for rough vaccines to be efficient against *Brucella abortus* and *Brucella ovis* in the mouse model. *Infect Immun.* 71: 3261-71.
16. Nahid, S., Haghkhah, M. (2011) An efficient method for gene disruption in *Brucella abortus* by overlap extension PCR. *Asian J Biothechnol.* 3: 275-279.
17. Nicoletti, P. (2010) Brucellosis: past, present and future. *Biol Med.* 31: 21-32.
18. Oswald, R.C., Folkerts, O., Fei, Z. (2008) Ge-

به داخل باکتری بروسلا و انتقال کاست هدف به طور خودبخود از بین می‌رود. همچنین به جهت دارا بودن اپرون *LacZ* و غربالگری سفید و آبی، امکان تفکیک باکتری‌هایی که عمل ریکامینیشن با موفقیت در آنها انجام شده است را از سایر باکتری‌ها فراهم می‌کند (۵). بنابراین عمل همسانه سازی با استفاده از آنزیم‌هایی که در محل مربوط به کلونینگ از پلاسمید pBluescriptIIISK(-) دارای محل برش هستند، انجام می‌گیرد و پس از اینکه این مرحله با استفاده مجدد از آنزیم‌ها و تعیین توالی شدن تأیید شد با روش انتقال الکتریکی جایگزین ژن هدف در باکتری بروسلا خواهد شد. باکتری بروسلا به علت پذیرش تعداد محدودی از پلاسمیدها، سخت رشد بودن، نیازهای بسیار جهت رشد و طولانی بودن زمان تکثیر با مشکلات زیادی هنگام انجام تحقیقات مولکولی همراه است. منتها در این روش به علت استفاده از پلاسمیدهای مناسب و توالی‌های بلند در دو طرف ژن که احتمال ریکامینیشن را افزایش می‌دهد و منجر به ایجاد یک رشته بلند با نقاط همپوشانی بسیار با ژنوم باکتری می‌شود، با موفقیت و صرف وقت و هزینه کمتر در این باکتری به انجام رسید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت تصویب این پروژه به شماره ۷۵۰۴۰۰۲/۶/۱۷/۱۷ تشکر و قدردانی می‌گردد.



- nome sequence of *Brucella abortus* vaccine strain S19 compared to virulent strains yields candidate virulence genes. PLOS. 3: e2193.
19. Poester, F.P., Samartino, L.E., Santos, R.L. (2013) Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock. Rev Sci Tech. 32: 105-115.
 20. Priscilla, C.H., Rene, M.T. (2000) Identification of genes required for chronic persistence of *Brucella abortus* in mice. Infect Immun. 68: 4102-7.
 21. Ragan, V.E. (2002) The animal and plant health inspection service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. Vet microbiol. 90: 11-8.
 22. Saeedinia, A.R., Zeinoddini, M., Soleimani, M. (2013) Deletion of perosamine synthetase gene in *Brucella melitensis* Rev1 to generate the attenuated mutant strain. J Police Med. 2: 127-138.
 23. Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (3rd ed.) CSHL Press. New York, USA.
 24. Wallach, J.C., Ferrero, M.C., Victoria, M.D. (2008) Occupational infection due to *Brucella abortus* S19 among workers involved in vaccine production in Argentina. Clin Microbiol Infect. 14: 805-7.



Construction of mutant WbkA gene in *Brucella abortus* S19 by overlap extension PCR

Naserli, S.¹, Zahraei salehi, T.¹, Nayeri fassayi, B.^{1*}, Saeedinia, A.², Ashrafi tamami, I.¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

²Department of Genetics, Sciences and Biotechnology Research Center, Mallek-Ashtar University of Technology, Tehran-Iran

(Received 18 April 2015, Accepted 6 July 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Causing site direct mutation can be one of the efficient methods to evaluate the characteristics and properties of various genes. Brucellosis is the most common zoonotic infectious disease that would cause great economic losses. Thus, recognition of pathogenic and immunogenic factors in the genus *Brucella* can lead to control this health problem. **OBJECTIVES:** Considering the importance of site direct mutation in identification of genome structure and numerous ways to achieve this goal, Overlap Extension PCR is introduced as an improved technique for the removal and replacement of the gene target. **METHODS:** For this study, with two-step PCR using specific primers, upstream and downstream fragments from target gene and antibiotic resistance cassette from plasmid pET28a (+), were reproduced and were connected to each other. The resulting fragment was cloned in specific position of pBluescriptIISK(-) plasmid by the restriction enzymes. Then, the construction was transferred into the genome of *Brucella abortus* by electroporation method. **RESULTS:** Fusion PCR product was obtained without any change in the nucleotide sequence and then it was cloned into pBluescriptIISK (-) plasmid, finally the construction was replaced and the target gene was deleted. **CONCLUSIONS:** The results of this study show that the Overlap Extension PCR is an optimized and modified technique to create mutations in the bacterial genome structure and can easily be used in the family *Brucella*.

Keyword: *Brucella abortus*, mutation, overlap extension PCR

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Sequence of primers. The segments that shown as underlined letters in primers 1 and 4 are xhoI and xbaI cut sites. The segments that are shown as underlined letters in primers 2 and 3 complementary to the genome of *Brucella abortus* S19.

Figure 1. Schematic illustration of Overlap Extension PCR and cloning procedure into the pBluescriptIISK (-)

Figure 2. Result of PCR products and digestion with restriction Enzymes. 2a, PCR product on 1% agarose gel. Lane 1: 1Kb DNA ladder, Lane 2: Fusion PCR product. 2b, cloning product on 1% agarose gel. Lane 1: 1Kb DNA ladder, Lane 2: Negative control, Lane 3, 4: digested construct pBluescript by xbaI, xhoI respectively, Lane 5: digested construct pBluescript by xbaI, xhoI simultaneously, pBluescript (2956 bp) and Fusion PCR product (1846bp) are separated. 2c, PCR product with primers 1, 4 on extracted DNA from electroporated and grown bacteria on rich media by Antibiotics. Lane 1: 1Kb DNA ladder, Lane 2: PCR product.



*Corresponding author's email: nayerib@ut.ac.ir, Tel: 021-61117050, Fax: 021-66923748

J. Vet. Res. 70, 3:317-323, 2015