



طراحی و ساخت ناقل نوترکیب pTargetF حمل کننده gRNA ژن entB برای CRISPR/Cas9 در ایکلای سروگروه O2

Design and Construction of a Recombinant pTargetF Vector Carrying an entB gRNA for the CRISPR/Cas9 in *E. coli* Serogroup O2

محدثه امیری^۱، مهدی گلچین^{۱*}، عباس حاجی زاده^۲، حمیدرضا فرزین^۳، مجید جمشیدیان مجاور^۳

Mohadese Amiri¹, Mehdi Golchin^{*1}, Abbas Hajizade², Hamidreza Farzin³, Majid Jamshidian-Mojaver³

۱- گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران.

۲- مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه امام حسین، تهران، ایران.

۳- موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران.

1- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

2- Biology Research Center, Faculty of Basic Sciences, Imam Hossein University, Tehran, Iran.

3- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.

*Corresponding Author, Email: golchin@uk.ac.ir

golchin@uk.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۲۸ - تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۲/۲۸)

Received: 2026/02/20 | Accepted: 2026/03/19 | Published: 2026/03/19

Abstract

Colibacillosis caused by *Escherichia coli* serotype O2 is one of the major bacterial diseases in the poultry industry, leading to substantial economic losses. The increasing prevalence of antibiotic resistance among pathogenic strains has highlighted the necessity for alternative strategies, including the development of vaccines and attenuated strains. The aim of this study was to design and construct a recombinant CRISPR/Cas9 vector carrying a specific gRNA targeting the *entB* gene in *E. coli* serotype O2, as an initial step toward the development of an attenuated strain. In this study, a specific gRNA against the *entB* gene was designed using the CHOPCHOP web tool. The forward and reverse oligonucleotides corresponding to the gRNA were synthesized and, following annealing, were ligated into the BbsI-linearized pTargetF plasmid using T4 DNA ligase. The resulting recombinant vector was then transformed into competent DH5α cells. The successful insertion of the gRNA fragment into the vector was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) and subsequent sequencing. The results demonstrated that the designed guide sequence was successfully cloned into the pTargetF vector. The observation of the expected bands in PCR analysis confirmed the correct construction of the recombinant construct. Based on the findings of this study, the designed recombinant vector can serve as a preliminary tool for targeting the *entB* gene and for future investigations aimed at attenuating pathogenic *E. coli* strains in poultry.

Keywords: *Escherichia coli*, serogroup O2, CRISPR/Cas9, *entB*, gRNA, recombinant vector, colibacillosis

چکیده

رفرنس دهی این مقاله Citation

Amiri M, Golchin M, Hajizade A, Farzin H, Jamshidian-Mojaver M. (2026). Design and Construction of a Recombinant pTargetF Vector Carrying an entB gRNA for the CRISPR/Cas9 in *E. coli* Serogroup O2. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 14 (2): 269-281. Doi: [10.61882/gebsj.14.2.4](https://doi.org/10.61882/gebsj.14.2.4)
URL: <http://gebsj.ir/article-1-554-fa.html>

Genetic Engineering and Biosafety Journal Volume 14, Number 2, 2026

خلاصه

کلی باسیلوز ناشی از *Escherichia coli* سروگروه O2 یکی از بیماری‌های مهم باکتریایی در صنعت طیور است که می‌تواند خسارات اقتصادی قابل توجهی ایجاد کند. افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های بیماری‌زا، ضرورت استفاده از راهکارهای جایگزین از جمله طراحی واکسن‌ها و سویه‌های تخفیف حدت یافته را برجسته کرده است. هدف از این مطالعه، طراحی و ساخت ناقل نو ترکیب CRISPR/Cas9 حامل gRNA اختصاصی ژن *entB* در *E. coli* سروگروه O2 به‌عنوان گامی اولیه در مسیر طراحی سویه تخفیف حدت یافته بود. در این مطالعه، gRNA اختصاصی علیه ژن *entB* با استفاده از پایگاه CHOPCHOP طراحی شد. الیگونوکلوئیدهای رفت و برگشت مربوط به gRNA سنتز شده و پس از آنیلینگ (annealing)، درون پلاسمید pTargetF خطی شده با آنزیم BbsI، با استفاده از T4 DNA Ligase جایگذاری شدند. ناقل نو ترکیب حاصل به سلول‌های مستعد DH5α منتقل شد و ورود قطعه gRNA به داخل وکتور با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و همچنین تعیین توالی تأیید گردید. نتایج نشان داد که توالی راهنمای طراحی شده با موفقیت در وکتور pTargetF کلون شده است. مشاهده باندهای مورد انتظار در آزمون PCR، صحت ساخت سازه نو ترکیب را تأیید کرد. بر اساس یافته‌های این پژوهش، ناقل نو ترکیب طراحی شده می‌تواند به‌عنوان ابزاری مقدماتی برای هدف‌گیری ژن *entB* و مطالعات بعدی در زمینه تخفیف حدت سویه‌های بیماری‌زای *E. coli* طیور مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: /شریشیا کلی، سروگروه O2، CRISPR/Cas9، *entB*، gRNA، ناقل نو ترکیب، کلی باسیلوز

مقدمه

Introduction

سیستم Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated proteins (CRISPR-Cas) به‌عنوان یکی از پیشرفته‌ترین ابزارهای ویرایش ژنوم، انقلابی در زیست‌شناسی مولکولی و پزشکی ایجاد کرده است (Hryhorowicz et al., 2017; Hille et al., 2018). این سیستم که بر اساس مکانیسم ایمنی تطبیقی باکتری‌ها طراحی شده، از دو جزء کلیدی یعنی RNA راهنما (gRNA) و آنزیم اندونوکلاز Cas9 تشکیل می‌شود؛ به‌گونه‌ای که gRNA با طراحی مکمل توالی هدف، آنزیم Cas9 را به ناحیه موردنظر ژنوم هدایت کرده و این آنزیم با ایجاد شکست‌های دورشته‌ای دقیق، امکان حذف، جایگزینی یا اصلاح توالی‌های ژنی را فراهم می‌آورد (Barrangou et al., 2007; Shmakov et al., 2017). علیرغم موفقیت‌های خیره‌کننده این فناوری در مدل‌های مختلف سلولی و جانوری، چالش اساسی که همواره محققان را با محدودیت مواجه ساخته، عدم قطعیت کارایی برش و بروز اثرات خارج از هدف (Off-target) است که می‌تواند منجر به جهش‌های ناخواسته و حتی پیامدهای سرطان‌زایی در کاربردهای درمانی گردد (Mojica and Rodriguez-Valera., 2016; Hille et al., 2018). با وجود پژوهش‌های گسترده در زمینه بهینه‌سازی این سیستم، هنوز به روشنی مشخص نشده است که تغییرات در ساختار ثانویه، طول و ترکیب نوکلئوتیدی gRNA چگونه بر میزان تمایل اتصال آن به آنزیم Cas9 و متعاقباً بر دقت و اختصاصی بودن برش در توالی‌های ژنومی پیچیده تأثیر می‌گذارد و اغلب مطالعات موجود به بررسی این پارامترها در شرایط استاندارد آزمایشگاهی پرداخته‌اند، درحالی‌که داده‌های کافی در مورد عملکرد این سیستم در بافت‌های خاص یا تحت شرایط استرس فیزیولوژیک در دسترس نیست (Barrangou et al., 2007; Loureiro and da Silva., 2019).

کلی باسیلوز در طیور (Avian colibacillosis) یکی از بیماری‌های مهم باکتریایی است که می‌تواند به‌صورت موضعی یا سیستمیک بروز کند و اغلب در شرایط تضعیف سیستم دفاعی میزبان، استرس‌های محیطی یا حضور سویه‌های حدت‌دار *E. coli* ایجاد می‌شود (Dziva and

(Stevens., 2008). اگرچه *E. coli* بخشی از میکروبیوتای طبیعی روده و برخی سطوح مخاطی میزبان است، اما برخی سویه‌ها با کسب فاکتورهای حدت قادر به ایجاد بیماری در پرندگان هستند. سویه‌های بیماری‌زای پرندگان یا Avian Pathogenic *E. coli* (APEC)، به‌عنوان بخشی از گروه Extraintestinal Pathogenic *E. coli* (ExPEC) طبقه‌بندی می‌شوند (Dziva and Stevens., 2008). عفونت‌های ناشی از APEC معمولاً از طریق دستگاه تنفس و کیسه‌های هوایی آغاز می‌شوند و عواملی مانند عفونت‌های میکوپلاسمایی، عفونت‌های ویروسی، تراکم بالا، تهویه نامناسب و تماس طولانی‌مدت با گاز آمونیاک می‌توانند زمینه‌ساز بروز بیماری باشند. همچنین آلودگی سطح تخم با مدفوع، بستر، دان و آب آلوده می‌تواند در انتقال *E. coli* و گسترش عفونت در گله نقش داشته باشد (Johnson *et al.*, 2002).

آهن یکی از عناصر ضروری برای رشد و تکثیر باکتری‌ها در بدن میزبان است؛ با این حال، دسترسی به آهن آزاد در محیط بدن میزبان محدود بوده و باکتری‌های بیماری‌زا برای غلبه بر این محدودیت از سامانه‌های اختصاصی جذب آهن استفاده می‌کنند. سویه‌های بیماری‌زای پرندگان *Escherichia coli* یا APEC دارای چندین سامانه جذب آهن هستند که شامل تولید سیدروفورهای مانند انتروباکترین، آئروباکترین و سالموکلین و همچنین ناقل‌های اختصاصی برداشت آهن می‌شوند. ژن‌های کدکننده این سامانه‌ها در بسیاری از سویه‌های APEC گزارش شده‌اند و در بقا و حدت باکتری در میزبان نقش دارند (Yogarathnam., 1995).

انتروباکترین یکی از سیدروفورهای مهم در *E. coli* است و ژن *entB* در مراحل اولیه بیوسنتز آن نقش دارد. با توجه به نقش این ژن در مسیر تولید انتروباکترین، غیرفعال‌سازی *entB* می‌تواند تولید این سیدروفور را مختل کرده و توانایی باکتری در جذب آهن را کاهش دهد (Gehring *et al.*, 1998; Pakarian and Pawelek., 2016). در نتیجه، انتظار می‌رود سویه‌های دارای اختلال در ژن *entB* در شرایط کم‌آهن، مانند محیط بدن میزبان، با محدودیت رشد و کاهش توان بیماری‌زایی مواجه شوند. این ویژگی، ژن *entB* را به یک هدف مناسب برای مطالعات تخفیف حدت و طراحی سامانه‌های ویرایش ژنی هدفمند تبدیل می‌کند. بر این اساس، هدف از مطالعه حاضر طراحی و ساخت ناقل نو ترکیب pTargetF حمل کننده gRNA اختصاصی ژن *entB* برای سامانه CRISPR/Cas9 در *Escherichia coli* سروگروه O2 می‌باشد.

Materials and Methods

مواد و روش‌ها

طراحی پرایمر برای تکثیر ژن *entB*

برای طراحی پرایمر اختصاصی جهت تکثیر ژن *entB*، ابتدا توالی نوکلئوتیدی این ژن مربوط به *Escherichia coli* سروگروه O2 با شماره دسترسی (NZ_LSZR01000193 NZ_LSZR01000000) از پایگاه داده NCBI دریافت شد. سپس توالی‌های مربوط به ژن *entB* در چند سویه دیگر *E. coli* سروگروه O2 با استفاده از نرم‌افزار Clustal Omega هم‌ردیف‌سازی شدند تا نواحی حفاظت‌شده ژن و تغییرات احتمالی نوکلئوتیدی میان سویه‌ها مشخص شود. بر اساس نواحی حفاظت‌شده، یک جفت پرایمر اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار OligoCalc و بررسی دستی طراحی شد که قطعه‌ای به طول ۱۰۳۵ جفت‌باز از ژن *entB* را تکثیر می‌کند. ویژگی‌های پرایمرها از نظر طول، درصد GC، دمای ذوب، احتمال تشکیل دایمر و ساختار سنجاق‌سری بررسی شد. توالی پرایمرهای طراحی‌شده در جدول ۱ ارائه شده است.

```
CTGATGGGCGAAAAAGCTGTGCTTATCTGGTGGTAAAAAGAGCCGCTGCGCGCGGTGCAGGTGCGTTCGTTCTGCGTGAACAGGGTATTGCC
GAATTTAAATTACCGGATCGCGTGGAGTGTGTAGATTCACTTCCGCTGACGGCGGTTCGGTAAAGTCGATAAAAAACAATTACGTCAGTGGCTG
GCGTCACGCACATCAGCCTGAAGGAGAGAACACGATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACTGCCGAGTCTCACGATATTCCGCAGA
ATAAAGTCGACTGGGCCCTTTGAACCGCAACGTCGCCGCTTGTAAATCCATGATATGCAGGACTATTTGTACGCTTCTGGGGTGAGAACTGCC
GATGATGGAGCAGGTGATCGCGAATATTGCGGCACTACGCGACTACTGCAAAACAGCACAATATCCCGGTTTATTACACCGCCAGCCGAAAG
AGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTGAATGATATGTGGGGGCGTGGCTGACCCGTTTCGCCGGAACAGCAAAAGGTGGTGGATCGCCTG
ACGCCAGATGCCGACGACCGGTGCTGGTGAAGTGGCGCTACAGCGCGTTTCATCGTTCCCGCTGGAGCAAATGCTGAAAGAGAGTGGACG
TAACCAAGCTGATTATTACCGGGGTATATGCCACATTGGCTGTATGACCACCGCAACGAGCAGCATTATGCGCGATATTAACCGTTTATGGTG
GCGGATGCGCTGGCCGATTTCAGCCGTGACGAGCATTTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGACGTTCTGGTGGGTGGTGTATGACCGAAGAA
TTGCTGCCAGCACCTATCCCGCCAGCAAAAGCGGAGCTGCGTGAGGTGATCCTGCCGTTGCTGGACGAGTCCGATGAACCTTCGATGACGAC
AACCTGATCGACTACGGTCTGGATTCCGTGCGCATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAAGTGCATGGCGATATCGACTTTGTCATGCTG
GCGAAAAACCGACCATCGACGCTGGTGGAAAGCTACTCTCCGCGAGGTGAAATAATGGATTTCAGCGGTAAAAATGTCTGGGTAACCTGGC
GCGGGGAAAGGTATCGGCTATGCCACGGCGCTGGCATTTGTTGAGGCGGGGCGCAAAAGTTACAGG
```

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن *entB*Table 1. Sequences of primers designed for amplification of the *entB* gene

Product size	Sequence (5'→3')	Primer name
<i>entB</i> -F	TGTGTAGATTCACTTCCGCTGA	1035 bp
<i>entB</i> -R	TGGCATAGCCGATACCTTTC	

طراحی gRNA اختصاصی ژن *entB*

به منظور طراحی gRNA اختصاصی برای هدف گیری ژن *entB*، توالی این ژن به عنوان ورودی در پایگاه CHOPCHOP وارد شد. طراحی gRNA بر اساس سامانه SpCas9 و توالی PAM به صورت 5'-NGG-3' انجام گرفت. gRNA نهایی بر اساس معیارهایی مانند قرارگیری در ناحیه حفاظت شده ژن، امتیاز کارایی مناسب، اختصاصیت بالا و حداقل احتمال off-target انتخاب شد. در توالی هدف انتخاب شده، جایگاه PAM با توالی TGG در مجاورت ناحیه هدف قرار داشت. بر این اساس، دو الیگونوکلوئید مکمل شامل توالی رفت و برگشت gRNA طراحی و برای سنتز به شرکت سیناکلون ارسال شد. شایان ذکر است که راهنمای ژنتیکی بر اساس جایگاه شناسایی شده در ناحیه کدکننده و از روی رشته کدکننده طراحی گردید؛ بنابراین توالی آن (به جز جایگاه شناسایی) هم معنی با رشته کدکننده بوده و آنزیم را به سمت رشته الگو برای ایجاد برش هدایت می کند. توالی الیگونوکلوئیدهای طراحی شده در جدول ۲ ارائه شده است.



شکل ۱- نمونه هایی برگرفته از مولکول راهنمای gRNA از پایگاه CHOPCHOP جهت استفاده در مطالعه و نمای شماتیک از جایگاه اتصال gRNA و توالی PAM در ژن *entB*

Fig 1. gRNA Examples from the CHOPCHOP Database for Use in Study and a Schematic Representation of the gRNA Binding Site and PAM Sequence in the *entB* Gene

جدول ۲- توالی الیگونوکلو تیدهای gRNA طراحی شده برای هدف گیری ژن *entB*

Table 2. Sequences of oligonucleotides designed for construction of *entB*-specific gRNA

Oligonucleotide name	Sequence (5'→3')
gRNA-F	TGCGGAATATCGTGAGACTC
gRNA-R	GAGTCTCACGATATTCCGCA

آنیلینگ (annealing) الیگونوکلو تیدهای gRNA، خطی سازی پلاسمید pTargetF و لایگیشن (ligation)

برای تهیه قطعه دورشته ای gRNA، الیگونوکلو تیدهای مکمل gRNA-F و gRNA-R در شرایط آنیلینگ قرار گرفتند. بدین منظور، واکنش آنیلینگ در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر از الیگونوکلو تید gRNA-F، ۳ میکرولیتر از الیگونوکلو تید gRNA-R، ۴ میکرولیتر ۰.۵ M NaCl و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه شد. مخلوط واکنش در دمای ۹۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ترموسایکلر قرار گرفت و سپس میکروتیوب درون دستگاه باقی ماند تا به تدریج تا دمای اتاق سرد شود. قطعه دورشته ای حاصل برای مرحله لایگیشن با وکتور pTargetF خطی شده مورد استفاده قرار گرفت.

پلاسمید pTargetF مورد استفاده در این پژوهش از شرکت Addgene تهیه شد. به منظور وارد کردن قطعه gRNA در وکتور pTargetF، ابتدا پلاسمید با استفاده از آنزیم BbsI خطی سازی شد. واکنش هضم آنزیمی در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۲۵ میکرولیتر پلاسمید pTargetF، ۱ میکرولیتر آنزیم BbsI شرکت Thermo Scientific، ۵ میکرولیتر بافر Green Buffer شرکت Thermo Scientific و ۱۹ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. پس از پایان هضم آنزیمی، محصول واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و خطی شدن پلاسمید بر اساس مشاهده باند در اندازه مورد انتظار بررسی گردید.

پس از تأیید خطی شدن وکتور، قطعه دورشته ای gRNA حاصل از آنیلینگ به وکتور pTargetF خطی شده متصل شد. واکنش لایگیشن در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر وکتور خطی شده، ۲ میکرولیتر محصول آنیلینگ، ۱ میکرولیتر بافر 10X T4 DNA Ligase، ۱ میکرولیتر آنزیم T4 DNA Ligase شرکت Thermo Scientific و ۱ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه شد. مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۶ درجه سانتی گراد در ترموسایکلر انکوبه شد و سپس برای انتقال به سلول های مستعد DH5α مورد استفاده قرار گرفت.

انتقال ناقل نو ترکیب به سلول DH5α

برای تهیه سلول های مستعد، سویه DH5α تهیه شده از شرکت NEB با روش شیمیایی مبتنی بر کلرید کلسیم (۱۰ میلی مولار) آماده سازی شد (Gholami et al., 2002). به منظور انتقال ناقل نو ترکیب، به میکروتیوب حاوی سلول های مستعد، ۷ میکرولیتر از محصول لایگیشن افزوده شد. به عنوان کنترل منفی، به میکروتیوب حاوی سلول های مستعد، به جای محصول لایگیشن، ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شدند و سپس به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. بلافاصله پس از شوک حرارتی، میکروتیوب ها به مدت ۳ دقیقه روی یخ منتقل شدند.

در ادامه، به هر میکروتیوب ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع LB استریل اضافه شد و نمونه ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور شیکر دار انکوبه شدند. پس از مرحله ریکاوری، میکروتیوب ها به مدت ۳ دقیقه در ۱۰۰۰ × g سانتریفیوژ شدند. سپس بخش عمده مایع رویی تخلیه شد و حدود ۱۵۰ میکرولیتر از آن در میکروتیوب باقی ماند. رسوب باکتریایی به آرامی در حجم باقی مانده مخلوط شد و کل حجم ۱۵۰ میکرولیتر روی محیط کشت جامد LB agar حاوی اسپکتینومایسین (غلظت نهایی ۸۰ میکروگرم، سیگما) در میلی لیتر کشت داده شد. در نهایت، پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. رشد کلنی ها روی محیط حاوی اسپکتینومایسین به عنوان شاخص اولیه انتقال پلاسمید دارای ژن مقاومت در نظر گرفته شد.

تأیید PCR برای ورود قطعه gRNA به پلاسمید pTargetF

به منظور تأیید ورود قطعه gRNA به داخل پلاسمید pTargetF، واکنش Colony PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. برای تهیه DNA الگو، چند کلنی رشد کرده روی محیط انتخابی به صورت جداگانه انتخاب شدند و هر کلنی در ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل سوسپانسیون شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده شدند و پس از سرد شدن، از محلول حاصل به عنوان DNA الگو در واکنش PCR استفاده گردید.

واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر 2X PCR Master Mix شرکت Amplicon، ۰.۵ میکرولیتر از پرایمر رفت، ۰.۵ میکرولیتر از پرایمر برگشت، ۰.۵ میکرولیتر DNA الگو و ۳.۵ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه شد. برنامه واکنش PCR شامل یک چرخه دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه، سپس ۳۰ چرخه شامل دناتوراسیون در ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طولی‌سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه بود. در پایان، طولی‌سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ ثانیه انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شدند و پس از رنگ‌آمیزی، با استفاده از دستگاه ژل‌داک مشاهده گردیدند.

جدول ۳- توالی پرایمرهای مورد استفاده در Colony PCR برای تأیید ورود قطعه gRNA به وکتور pTargetF

Table 3. Primer sequences used in colony PCR for confirmation of gRNA insertion into the pTargetF vector			
Order of using primers	Primer name	sequence (5'→3')	Product size
First microtube	F-pTarget vector	AGCGAGTCAGTGAGCGAG	400
	R-pTarget vector	ACTCCACCGCTGATGACATC	
Second microtube	gRNA-F	TGCGGAATATCGTGAGACTC	270
	R-pTarget vector	ACTCCACCGCTGATGACATC	
Third microtube	F-pTarget vector	AGCGAGTCAGTGAGCGAG	150
	gRNA-R	GAGTCTCACGATATTCCGCA	

Results and Discussion

نتایج و بحث

طراحی پرایمر و بررسی حفاظت‌شدگی توالی ژن *entB*

برای شناسایی ژن *entB*، یک جفت پرایمر اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار OligoCalc و بررسی دستی طراحی شد. پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۱۰۳۵ جفت‌باز از ژن *entB* در نظر گرفته شدند. ویژگی‌های فیزیکی و ترمودینامیکی پرایمرهای *entB*-F و *entB*-R در شکل ۳ ارائه شده است.

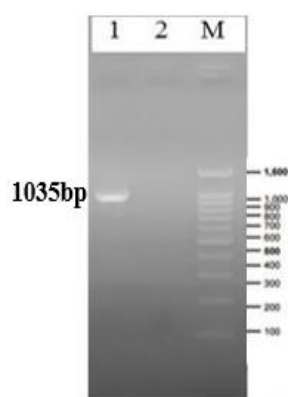
هم‌ردیف‌سازی توالی ژن *entB* در شش سویه مختلف *Escherichia coli* سروگروه O2 با استفاده از نرم‌افزار Clustal Omega انجام شد. نتایج نشان داد که ژن *entB* در سویه‌های بررسی شده از حفاظت‌شدگی بالایی، بیش از ۹۹ درصد، برخوردار است. در بیشتر نواحی، هم‌ردیفی کامل مشاهده شد؛ با این حال، چند تغییر نوکلئوتیدی محدود شامل تعویض‌های نقطه‌ای در برخی موقعیت‌ها، از جمله حدود موقعیت‌های ۴۲۰، ۶۶۰ و انتهای ۳'، مشاهده گردید. نواحی انتخاب‌شده برای طراحی پرایمر در بخش‌های حفاظت‌شده ژن قرار داشتند. ارزیابی اثر احتمالی این تغییرات بر توالی پروتئینی یا عملکرد ژن نیازمند بررسی‌های تکمیلی است.

Analysis Results #1: TGTGTAGATTCACCTCCGCTGA							
Rating	:	91.0		3' end stability	:	-8.27	kcal/mol
Molecular Wt	:	6716.46		ΔH	:	-155.3	kcal/mol
Tm	:	58.35	°C	ΔS	:	-0.4	kcal/°K/mol
GC%	:	45.45		5' end ΔG	:	-6.59	kcal/mol
GC Clamp	:	2		Self Dimer (ΔG)	:	<u>-4.53</u>	kcal/mol
nmol/A ₂₆₀	:	4.85		Hairpin (ΔG)	:	<u>-0.43</u>	kcal/mol
ug/A ₂₆₀	:	32.6		Repeats (# of pairs)	:		kcal/mol
ΔG	:	-34.58	kcal/mol	Run (# of bases)	:		kcal/mol

Analysis Results #2: TGGCATAGCCGATACCTTTC

Rating	:	98.0		3' end stability	:	-7.06	kcal/mol
Molecular Wt	:	6068.04		ΔH	:	-159.4	kcal/mol
Tm	:	57.93	°C	ΔS	:	-0.42	kcal/°K/mol
GC%	:	50.0		5' end ΔG	:	-10.12	kcal/mol
GC Clamp	:	1		Self Dimer (ΔG)	:		kcal/mol
nmol/A ₂₆₀	:	5.41		Hairpin (ΔG)	:	<u>-1.01</u>	kcal/mol

ug/A ₂₆₀	:	32.82		Repeats (# of pairs)	:		kcal/mol
ΔG	:	-34.95	kcal/mol	Run (# of bases)	:	<u>3</u>	kcal/mol



شکل ۲- ویژگی‌های فیزیکی و ترمودینامیکی پرایمرهای *entB-F* و *entB-R* و تایید حضور ژن مربوط (چاهک ۱: سروگروه مورد مطالعه حاوی ژن *entB*، چاهک ۲: کنترل منفی (آب مقطر)، M: نشانگر ۱۰۰ bp)

Figure 2. Physical and thermodynamic properties of *entB-F* and *entB-R* primers and confirmation of the presence of the target gene (Lane 1: studied serotype containing *entB* gene; Lane 2: negative control (distilled water); M: 100 bp DNA marker).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

1c1|NZ_CP126940.1_gene_3558      ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACCTGCCGGAGTCTCATGATATTCGCGAGAAT      60
1c1|NZ_CP126926.1_gene_3633      ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACCTGCCGGAGTCTCATGATATTCGCGAGAAT      60
1c1|NZ_CP126937.1_gene_3343      ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACCTGCCGGAGTCTCATGATATTCGCGAGAAT      60
1c1|NZ_CP082772.1_gene_1450      ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACCTGCCGGAGTCTCATGATATTCGCGAGAAT      60
1c1|NZ_CP109921.1_gene_3374      ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACCTGCCGGAGTCTCATGATATTCGCGAGAAT      60
1c1|NZ_CP043181.1_gene_3808      ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACCTGCCGGAGTCTCATGATATTCGCGAGAAT      60
*****

1c1|NZ_CP126940.1_gene_3558      AAAGTCGACTGGGCGCTTTGAACCGCAACGTCGCCGCTTGTAAATCCATGATATGCAGGAC      120
1c1|NZ_CP126926.1_gene_3633      AAAGTCGACTGGGCGCTTTGAACCGCAACGTCGCCGCTTGTAAATCCATGATATGCAGGAC      120
1c1|NZ_CP126937.1_gene_3343      AAAGTCGACTGGGCGCTTTGAACCGCAACGTCGCCGCTTGTAAATCCATGATATGCAGGAC      120
1c1|NZ_CP082772.1_gene_1450      AAAGTCGACTGGGCGCTTTGAACCGCAACGTCGCCGCTTGTAAATCCATGATATGCAGGAC      120
1c1|NZ_CP109921.1_gene_3374      AAAGTCGACTGGGCGCTTTGAACCGCAACGTCGCCGCTTGTAAATCCATGATATGCAGGAC      120
1c1|NZ_CP043181.1_gene_3808      AAAGTCGACTGGGCGCTTTGAACCGCAACGTCGCCGCTTGTAAATCCATGATATGCAGGAC      120
*****

1c1|NZ_CP126940.1_gene_3558      TATTTTGTACAGCTTCTGGGGTGAGAACTGCCCGATGATGGAGCAGGTGATCGCGAATATT      180
1c1|NZ_CP126926.1_gene_3633      TATTTTGTACAGCTTCTGGGGTGAGAACTGCCCGATGATGGAGCAGGTGATCGCGAATATT      180
1c1|NZ_CP126937.1_gene_3343      TATTTTGTACAGCTTCTGGGGTGAGAACTGCCCGATGATGGAGCAGGTGATCGCGAATATT      180
1c1|NZ_CP082772.1_gene_1450      TATTTTGTACAGCTTCTGGGGTGAGAACTGCCCGATGATGGAGCAGGTGATCGCGAATATT      180
1c1|NZ_CP109921.1_gene_3374      TATTTTGTACAGCTTCTGGGGTGAGAACTGCCCGATGATGGAGCAGGTGATCGCGAATATT      180
1c1|NZ_CP043181.1_gene_3808      TATTTTGTACAGCTTCTGGGGTGAGAACTGCCCGATGATGGAGCAGGTGATCGCGAATATT      180
*****

1c1|NZ_CP126940.1_gene_3558      GCGGCACCTACGGGACTACTGCAAAACAGCACAAATATCCCGGTTTATTACACCGCCAGCGG      240
1c1|NZ_CP126926.1_gene_3633      GCGGCACCTACGGGACTACTGCAAAACAGCACAAATATCCCGGTTTATTACACCGCCAGCGG      240
1c1|NZ_CP126937.1_gene_3343      GCGGCACCTACGGGACTACTGCAAAACAGCACAAATATCCCGGTTTATTACACCGCCAGCGG      240
1c1|NZ_CP082772.1_gene_1450      GCGGCACCTACGGGACTACTGCAAAACAGCACAAATATCCCGGTTTATTACACCGCCAGCGG      240
1c1|NZ_CP109921.1_gene_3374      GCGGCACCTACGGGACTACTGCAAAACAGCACAAATATCCCGGTTTATTACACCGCCAGCGG      240
1c1|NZ_CP043181.1_gene_3808      GCGGCACCTACGGGACTACTGCAAAACAGCACAAATATCCCGGTTTATTACACCGCCAGCGG      240
*****

1c1|NZ_CP126940.1_gene_3558      AAAGAGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGCGCTGGCGCTGACC      300
1c1|NZ_CP126926.1_gene_3633      AAAGAGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGCGCTGGCGCTGACC      300
1c1|NZ_CP126937.1_gene_3343      AAAGAGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGCGCTGGCGCTGACC      300
*****

1c1|NZ_CP082772.1_gene_1450      AAAGAGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGCGCTGGCGCTGACC      300
1c1|NZ_CP109921.1_gene_3374      AAAGAGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGCGCTGGCGCTGACC      300
1c1|NZ_CP043181.1_gene_3808      AAAGAGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGCGCTGGCGCTGACC      300
*****

1c1|NZ_CP126940.1_gene_3558      CGTTCCGCGGAAACAGCAAAAGGTGGTGGATCGGCTGACGCCAGATGCCAGCAGCGGTCG      360
1c1|NZ_CP126926.1_gene_3633      CGTTCCGCGGAAACAGCAAAAGGTGGTGGATCGGCTGACGCCAGATGCCAGCAGCGGTCG      360
1c1|NZ_CP126937.1_gene_3343      CGTTCCGCGGAAACAGCAAAAGGTGGTGGATCGGCTGACGCCAGATGCCAGCAGCGGTCG      360
1c1|NZ_CP082772.1_gene_1450      CGTTCCGCGGAAACAGCAAAAGGTGGTGGATCGGCTGACGCCAGATGCCAGCAGCGGTCG      360
1c1|NZ_CP109921.1_gene_3374      CGTTCCGCGGAAACAGCAAAAGGTGGTGGATCGGCTGACGCCAGATGCCAGCAGCGGTCG      360
1c1|NZ_CP043181.1_gene_3808      CGTTCCGCGGAAACAGCAAAAGGTGGTGGATCGGCTGACGCCAGATGCCAGCAGCGGTCG      360
*****

1c1|NZ_CP126940.1_gene_3558      CTGGTGAATGCGGCTACAGCGCATTTTCATCGTTCTCCGCTGGAGCAAAATGCTCAAGAG      420
1c1|NZ_CP126926.1_gene_3633      CTGGTGAATGCGGCTACAGCGCATTTTCATCGTTCTCCGCTGGAGCAAAATGCTCAAGAG      420
1c1|NZ_CP126937.1_gene_3343      CTGGTGAATGCGGCTACAGCGCATTTTCATCGTTCTCCGCTGGAGCAAAATGCTCAAGAG      420
1c1|NZ_CP082772.1_gene_1450      CTGGTGAATGCGGCTACAGCGCATTTTCATCGTTCTCCGCTGGAGCAAAATGCTCAAGAG      420
1c1|NZ_CP109921.1_gene_3374      CTGGTGAATGCGGCTACAGCGCATTTTCATCGTTCTCCGCTGGAGCAAAATGCTCAAGAG      420
1c1|NZ_CP043181.1_gene_3808      CTGGTGAATGCGGCTACAGCGCATTTTCATCGTTCTCCGCTGGAGCAAAATGCTCAAGAG      420
*****

1c1|NZ_CP126940.1_gene_3558      AGTGGAGTAACACAGCTGATTATTACCGGGGTATATGCCACATTGGCTGTATGACCAAC      480
1c1|NZ_CP126926.1_gene_3633      AGTGGAGTAACACAGCTGATTATTACCGGGGTATATGCCACATTGGCTGTATGACCAAC      480
1c1|NZ_CP126937.1_gene_3343      AGTGGAGTAACACAGCTGATTATTACCGGGGTATATGCCACATTGGCTGTATGACCAAC      480
1c1|NZ_CP082772.1_gene_1450      AGTGGAGTAACACAGCTGATTATTACCGGGGTATATGCCACATTGGCTGTATGACCAAC      480
1c1|NZ_CP109921.1_gene_3374      AGTGGAGTAACACAGCTGATTATTACCGGGGTATATGCCACATTGGCTGTATGACCAAC      480
1c1|NZ_CP043181.1_gene_3808      AGTGGAGTAACACAGCTGATTATTACCGGGGTATATGCCACATTGGCTGTATGACCAAC      480
*****

1c1|NZ_CP126940.1_gene_3558      GCAACGGAGCGCATTTATGCGCGATATTAAACCGTTTATGGTGGCGGATGCGCTGGCCGAT      540
1c1|NZ_CP126926.1_gene_3633      GCAACGGAGCGCATTTATGCGCGATATTAAACCGTTTATGGTGGCGGATGCGCTGGCCGAT      540
1c1|NZ_CP126937.1_gene_3343      GCAACGGAGCGCATTTATGCGCGATATTAAACCGTTTATGGTGGCGGATGCGCTGGCCGAT      540
1c1|NZ_CP082772.1_gene_1450      GCAACGGAGCGCATTTATGCGCGATATTAAACCGTTTATGGTGGCGGATGCGCTGGCCGAT      540
1c1|NZ_CP109921.1_gene_3374      GCAACGGAGCGCATTTATGCGCGATATTAAACCGTTTATGGTGGCGGATGCGCTGGCCGAT      540
1c1|NZ_CP043181.1_gene_3808      GCAACGGAGCGCATTTATGCGCGATATTAAACCGTTTATGGTGGCGGATGCGCTGGCCGAT      540
*****

1c1|NZ_CP126940.1_gene_3558      TTTCAGCCTGACGAGCATTTTATGTCCTGAAATATGTGGCGGACCTTGTGGTGGGTCG      600

```

lcl NZ_CP126926.1_gene_3633	TTCAGCCGTCGACGAGCATTGTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGACGTTCTGGTCGGGTG	600
lcl NZ_CP126937.1_gene_3343	TTCAGCCGTCGACGAGCATTGTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGACGTTCTGGTCGGGTG	600
lcl NZ_CP082772.1_gene_1450	TTCAGCCGTCGACGAGCATTGTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGACGTTCTGGTCGGGTG	600
lcl NZ_CP109921.1_gene_3374	TTCAGCCGTCGACGAGCATTGTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGACGTTCTGGTCGGGTG	600
lcl NZ_CP043181.1_gene_3808	TTCAGCCGTCGACGAGCATTGTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGACGTTCTGGTCGGGTG	600

lcl NZ_CP126940.1_gene_3558	GTGATGACCGAAGAATTGCTGCCAGCACCTATCCCGCCAGCAAAGCGGGCTGCGTGAG	660
lcl NZ_CP126926.1_gene_3633	GTGATGACCGAAGAATTGCTGCCAGCACCTATCCCGCCAGCAAAGCGGGCTGCGTGAG	660
lcl NZ_CP126937.1_gene_3343	GTGATGACCGAAGAATTGCTGCCAGCACCTATCCCGCCAGCAAAGCGGGCTGCGTGAG	660
lcl NZ_CP082772.1_gene_1450	GTGATGACCGAAGAATTGCTGCCAGCACCTATCCCGCCAGCAAAGCGGGCTGCGTGAG	660
lcl NZ_CP109921.1_gene_3374	GTGATGACCGAAGAATTGCTGCCAGCACCTATCCCGCCAGCAAAGCGGGCTGCGTGAG	660
lcl NZ_CP043181.1_gene_3808	GTGATGACCGAAGAATTGCTGCCAGCACCTATCCCGCCAGCAAAGCGGGCTGCGTGAG	660

lcl NZ_CP126940.1_gene_3558	GTGATCCTGCCGTTGCTGGACGAGTCCGATGAACCCCTTCGATGACGACAACCTGATCGAC	720
lcl NZ_CP126926.1_gene_3633	GTGATCCTGCCGTTGCTGGACGAGTCCGATGAACCCCTTCGATGACGACAACCTGATCGAC	720
lcl NZ_CP126937.1_gene_3343	GTGATCCTGCCGTTGCTGGACGAGTCCGATGAACCCCTTCGATGACGACAACCTGATCGAC	720
lcl NZ_CP082772.1_gene_1450	GTGATCCTGCCGTTGCTGGACGAGTCCGATGAACCCCTTCGATGACGACAACCTGATCGAC	720
lcl NZ_CP109921.1_gene_3374	GTGATCCTGCCGTTGCTGGACGAGTCCGATGAACCCCTTCGATGACGACAACCTGATCGAC	720
lcl NZ_CP043181.1_gene_3808	GTGATCCTGCCGTTGCTGGACGAGTCCGATGAACCCCTTCGATGACGACAACCTGATCGAC	720

lcl NZ_CP126940.1_gene_3558	TACGGTCTGGATTGCTGCCGATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGC	780
lcl NZ_CP126926.1_gene_3633	TACGGTCTGGATTGCTGCCGATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGC	780
lcl NZ_CP126937.1_gene_3343	TACGGTCTGGATTGCTGCCGATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGC	780
lcl NZ_CP082772.1_gene_1450	TACGGTCTGGATTGCTGCCGATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGC	780
lcl NZ_CP109921.1_gene_3374	TACGGTCTGGATTGCTGCCGATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGC	780
lcl NZ_CP043181.1_gene_3808	TACGGTCTGGATTGCTGCCGATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGC	780

lcl NZ_CP126940.1_gene_3558	GATATCGACTTTGTCTATGCTGGCGAAAAACCGACCATCGACGCTGGTGGAGCTACTC	840
lcl NZ_CP126926.1_gene_3633	GATATCGACTTTGTCTATGCTGGCGAAAAACCGACCATCGACGCTGGTGGAGCTACTC	840
lcl NZ_CP126937.1_gene_3343	GATATCGACTTTGTCTATGCTGGCGAAAAACCGACCATCGACGCTGGTGGAGCTACTC	840
lcl NZ_CP082772.1_gene_1450	GATATCGACTTTGTCTATGCTGGCGAAAAACCGACCATCGACGCTGGTGGAGCTACTC	840
lcl NZ_CP109921.1_gene_3374	GATATCGACTTTGTCTATGCTGGCGAAAAACCGACCATCGACGCTGGTGGAGCTACTC	840
lcl NZ_CP043181.1_gene_3808	GATATCGACTTTGTCTATGCTGGCGAAAAACCGACCATCGACGCTGGTGGAGCTACTC	840

lcl NZ_CP126940.1_gene_3558	TCCCGCGAGGTGAAATAA 858	
lcl NZ_CP126926.1_gene_3633	TCCCGCGAGGTGAAATAA 858	
lcl NZ_CP126937.1_gene_3343	TCCCGCGAGGTGAAATAA 858	
lcl NZ_CP082772.1_gene_1450	TCCCGCGAGGTGAAATAA 858	
lcl NZ_CP109921.1_gene_3374	TCCCGCGAGGTGAAATAA 858	
lcl NZ_CP043181.1_gene_3808	TCCCGCGAGGTGAAATAA 858	

شکل ۳ - نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی ژن *entB* در شش سویه مختلف *Escherichia coli* سرگروه O2Figure 3. Alignment results of the *entB* gene sequence in six different *Escherichia coli* serogroup O2 strains.

برش آنزیمی pTargetF و ارزیابی ترانسفورماسیون

نتایج برش آنزیمی نشان داد که وکتور pTargetF با موفقیت خطی شده است، به‌طوری‌که یک باند منفرد در اندازه مورد انتظار در ژل مشاهده شد. همچنین رشد کلنی‌ها روی محیط کشت حاوی اسپکینومایسین نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز بودن ترانسفورماسیون و انتقال پلاسمید دارای ژن مقاومت به سلول‌های DH5α بود. در مقابل، در پلیت کنترل منفی رشدی مشاهده نشد. این یافته‌ها نشان دادند که سلول‌های باکتریایی توانسته‌اند پلاسمید را دریافت کنند. تأیید ورود قطعه gRNA به وکتور در مرحله بعد با استفاده از Colony PCR انجام شد. رشد کلنی‌ها بر روی این محیط دارای آنتی بیوتیک نشان‌دهنده موفقیت ترانسفورماسیون بود که سبب انتقال محصول لایگیشن و همچنین کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی از حضور وکتور نو ترکیب بود.

تأیید ورود قطعه gRNA به وکتور pTargetF با Colony PCR

نتایج حاصل از آنالیز الکتروفورزی محصولات PCR به منظور تأیید کلونینگ هر یک از gRNA ها در پلاسمید pTargetF نشان داد که باند ۴۰۰ جفت‌بازی با استفاده از پرایمرهای FC و RC به منظور اثبات کلونینگ وکتور در باکتری (چاهک ۱)، باند ۲۷۰ جفت‌بازی با استفاده از پرایمرهای (RpTarget vector/ gRNA- F) به منظور اثبات کلونینگ gRNA و باند ۱۵۰ جفت‌بازی با استفاده از پرایمرهای (gRNA- R / FpTarget vector) منظور اثبات کلونینگ gRNA در باکتری *E. coli* مستعد مشاهده گردید. همچنین به منظور تأیید نهایی صحت کلونینگ، پلاسمید نو ترکیب استخراج شده و برای تعیین توالی به شرکت پیشگام فرستاده شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench نسخه ۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنالیزها نشان داد که توالی gRNA کلون‌شده درون وکتور pTargetF

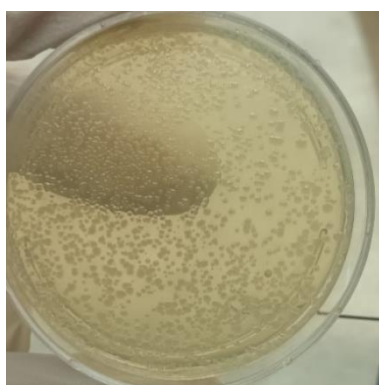
دارای تشابه ۱۰۰٪ (صد در صد) با توالی مورد انتظار است. این یافته به طور قطعی موفقیت آمیز بودن فرآیند کلونینگ و ساخت سازه نو ترکیب حاوی gRNA را تأیید می کند.

سامانه CRISPR/Cas9 به عنوان یکی از ابزارهای پرکاربرد در ویرایش ژنوم، به دلیل استفاده از مولکول راهنمای RNA برای شناسایی توالی هدف، نسبت به روش های پیشین مانند ZFN و TALEN از نظر طراحی ساده تر و انعطاف پذیرتر است (Kordzadeh-Kermani *et al.*, 2023). در این سامانه، تغییر توالی هدف عمدتاً از طریق طراحی مجدد بخش راهنمای gRNA انجام می شود، در حالی که در روش هایی مانند ZFN و TALEN برای هر توالی هدف نیاز به طراحی پروتئین های اختصاصی وجود دارد (Chandrasegaran and Carroll., 2016; Hille *et al.*, 2018). این ویژگی باعث شده است که CRISPR/Cas9 به ابزاری مناسب برای طراحی سامانه های هدفمند در مطالعات مهندسی ژنتیک باکتری ها تبدیل شود.

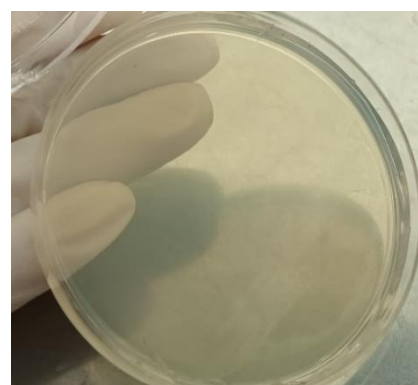


شکل ۴ - نتیجه برش آنزیمی وکتور. pTargetF چاهک ۱: نشانگر 1kb؛ چاهک ۲: وکتور pTargetF برش نخورده. چاهک ۳: وکتور pTargetF خطی شده.

Figure 4. The result of the enzymatic digestion of the pTargetF vector. Lane 1: 1 kb DNA ladder; Lane 2: Undigested pTargetF vector; Lane 3: Linearized pTargetF vector.



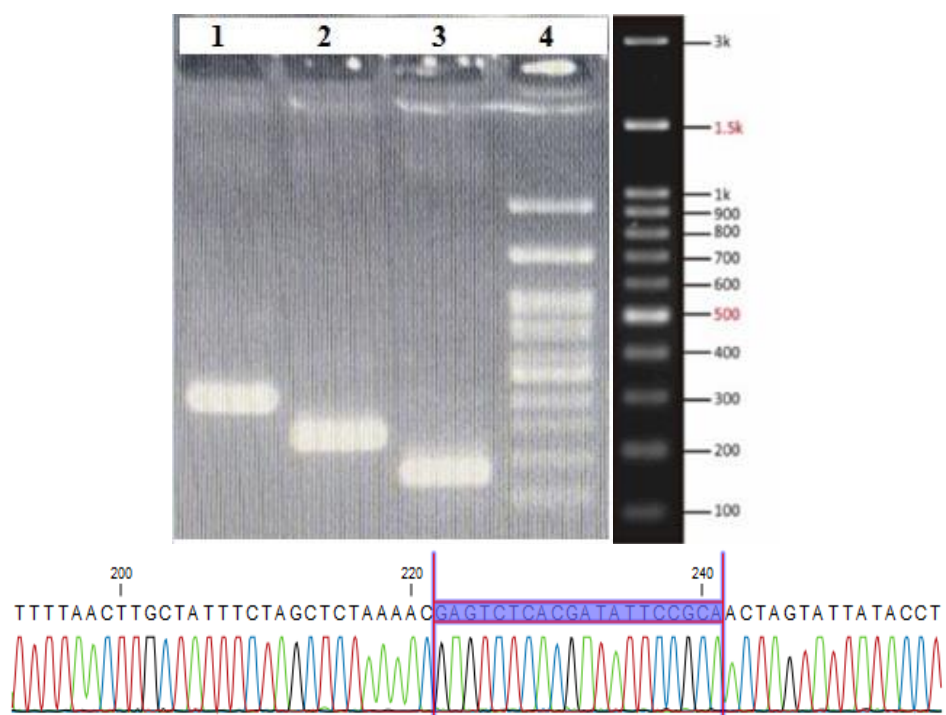
۱



۲

شکل ۵- پلیت ۱: کلنی های حاصل از ترانسفورماسیون روی محیط کشت جامد حاوی اسپکتینومايسين؛ پلیت ۲: کنترل منفی.

Figure 5. Plate 1: colonies obtained after transformation on solid culture medium containing spectinomycin; Plate 2: negative control.



شکل ۶- تأیید PCR و تعیین توالی ورود توالی gRNA به درون وکتور pTargetF چاهک ۱: محصول PCR با اندازه ۴۰۰ جفت باز؛ چاهک ۲: محصول PCR با اندازه ۲۷۰ جفت باز؛ چاهک ۳: محصول PCR با اندازه ۱۵۰ جفت باز؛ چاهک ۴: نشانگر DNA 100 bp.

Figure 6. Verification of gRNA cloning into the pTargetF vector using PCR and sequencing analysis. Lane 1: 400 bp PCR product; Lane 2: 270 bp PCR product; Lane 3: 150 bp PCR product; Lane 4: 100 bp DNA ladder.

در مطالعه حاضر، ناقل نو ترکیب pTargetF حامل gRNA اختصاصی ژن *entB* برای سامانه CRISPR/Cas9 طراحی و ساخته شد. انتخاب ژن *entB* به دلیل نقش آن در مسیر بیوسنتز انتروباکترین و ارتباط این مسیر با جذب آهن در *Escherichia coli* انجام گرفت. آهن یکی از عناصر ضروری برای رشد و تکثیر باکتری‌ها در بدن میزبان است، اما دسترسی به آهن آزاد در محیط بدن میزبان محدود است. بنابراین، سامانه‌های جذب آهن از جمله سیدروفورها می‌توانند در بقا و بیماری‌زایی سویه‌های بیماری‌زای *E. coli* نقش داشته باشند (Yogarathnam, 1995; Gehring et al., 1998). از این نظر، ژن *entB* می‌تواند به عنوان یکی از اهداف بالقوه برای مطالعات آینده در زمینه تخفیف حدت و بررسی نقش سامانه‌های جذب آهن مورد توجه قرار گیرد.

نتایج طراحی نشان داد که توالی هدف انتخاب شده در ناحیه‌ای حفاظت شده از ژن *entB* قرار دارد و دارای جایگاه مناسب PAM برای طراحی gRNA است. همچنین هم‌ردیف‌سازی توالی ژن *entB* در شش سویه مختلف *E. coli* سرگروه O2 نشان داد که این ژن از حفاظت‌شدگی بالایی برخوردار است. این موضوع از نظر طراحی پرایمر و gRNA اهمیت دارد، زیرا قرارگیری توالی هدف در ناحیه حفاظت شده می‌تواند احتمال کاربردپذیری سازه طراحی شده را در سویه‌های مشابه افزایش دهد. با این حال، اثر تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده شده بر توالی پروتئینی یا عملکرد ژن در این مطالعه بررسی نشد و نیازمند ارزیابی‌های تکمیلی است.

در مرحله ساخت سازه، خطی‌سازی وکتور pTargetF با آنزیم BbsI و سپس لایگیشن قطعه دورشته‌ای gRNA با وکتور انجام شد. رشد کلنی‌ها روی محیط حاوی اسپکترینومایسین نشان‌دهنده انتقال پلاسمید دارای ژن مقاومت به سلول‌های DH5α بود. با این حال، رشد روی محیط انتخابی به‌تنهایی برای تأیید ورود قطعه gRNA کافی نیست. به همین دلیل، تأیید سازه با استفاده از Colony PCR انجام شد. مشاهده

باند های مورد انتظار با اندازه های ۴۰۰، ۲۷۰ و ۱۵۰ جفت باز نشان داد که قطعه gRNA در وکتور pTargetF قرار گرفته و سازه نو ترکیب در سطح PCR تأیید شده است.

با وجود موفقیت در طراحی و ساخت ناقل نو ترکیب، باید توجه داشت که نتایج این مطالعه محدود به مرحله ساخت و تأیید PCR ی سازه است. در این پژوهش، انتقال سازه به سویه بیماری زای *E. coli* سروگروه O2، ایجاد جهش در ژن *entB*، بررسی حذف یا غیرفعال سازی ژن، و ارزیابی فنوتیپی کاهش جذب آهن یا کاهش حدت انجام نشده است. بنابراین، نمی توان بر اساس نتایج حاضر ادعا کرد که ژن *entB* غیرفعال شده یا بیماری زایی باکتری کاهش یافته است. برای تأیید عملکرد این سامانه، انجام آزمایش های تکمیلی از جمله تعیین توالی سازه نو ترکیب، بررسی off-target، انتقال سازه به سویه هدف، تأیید جهش در ژن *entB*، بررسی رشد در شرایط کم آهن و ارزیابی فنوتیپی یا بیماری زایی ضروری است.

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که طراحی و ساخت ناقل نو ترکیب pTargetF حامل gRNA اختصاصی ژن *entB* با موفقیت انجام شده است. این سازه می تواند به عنوان یک ابزار مقدماتی برای مطالعات بعدی در زمینه هدف گیری ژن *entB* و بررسی نقش آن در جذب آهن و تخفیف حدت سویه های بیماری زای *Escherichia coli* طیور مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به افزایش نگرانی ها درباره مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های باکتریایی، توسعه ابزارهای ژنتیکی هدفمند مانند CRISPR/Cas9 می تواند زمینه ساز مطالعات آینده برای طراحی راهکارهای جایگزین در کنترل عفونت های باکتریایی باشد (Hryhorowicz et al., 2017; Wang et al., 2023).

نتیجه گیری کلی: براساس نتایج این پژوهش، gRNA اختصاصی ژن *entB* با موفقیت طراحی و در وکتور pTargetF کلون شد. تأیید PCR سازه نو ترکیب نشان داد که قطعه gRNA در وکتور مورد نظر قرار گرفته است. این سازه می تواند به عنوان یک ابزار مقدماتی برای مطالعات بعدی در زمینه هدف گیری ژن *entB*، بررسی کارایی ویرایش ژنی و ارزیابی نقش این ژن در تخفیف حدت سویه های بیماری زای *Escherichia coli* طیور مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، تأیید عملکرد این سامانه نیازمند انجام آزمون های تکمیلی از جمله تعیین توالی سازه، انتقال به سویه هدف، بررسی ایجاد جهش در ژن *entB* و ارزیابی فنوتیپی در شرایط کم آهن است.

References

منابع

- Ashaar-Ghadim, E., Pazhouhandeh, M., Ahmadabadi, M. (2022). Potato Genome Editing Using CRISPR Technologies. *gebsj*, 11 (2) : 11. DOR:20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712. doi:10.1126/science.1138140.
- Chandrasegaran, S., & Carroll, D. (2016). Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. *Journal of Molecular Biology*, 428(5 Pt B), 963-989. doi:10.1016/j.jmb.2015.10.014.
- Dziva, F., & Stevens, M. P. (2008). Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*, 37(4), 355-366. doi: 10.1080/03079450802216652.
- Gehring, A. M., Mori, I., & Walsh, C. T. (1998). Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF. *Biochemistry*, 37(8), 2648-2659. doi: 10.1021/bi9726584.
- Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, 172(6), 1239-1259. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.032.
- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., & Słomski, R. (2017). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 65(3), 233-240. doi:10.1007/s00005-016-0427-5.
- Kordzadeh-Kermani, Z., Kheirandish, R., Sasan, H. (2023). Delivery methods of CRISPR/Cas-mediated genome editing system. *Gebsj*, 12 (1) ,145-156. DOR:20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2
- Johnson, J. R., & Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(3), 155-162. doi: 10.1067/mlc.2002.121550.

- Loureiro, A., & da Silva, G. J. (2019). CRISPR-Cas: Converting A Bacterial Defence Mechanism into A State-of-the-Art Genetic Manipulation Tool. *Antibiotics*, 8(1), 18. doi:10.3390/antibiotics8010018.
- Mojica, F. J. M., & Montoliu, L. (2016). On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends in Microbiology*, 24(10), 811–820. doi: 10.1016/j.tim.2016.06.005.
- Mojica, F. J., & Rodriguez-Valera, F. (2016). The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *The FEBS Journal*, 283(17), 3162–3169. doi:10.1111/febs.13766.
- Pakarian, P., & Pawelek, P. D. (2016). Intracellular co-localization of the *Escherichia coli* enterobactin biosynthetic enzymes EntA, EntB, and EntE. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(1), 25–32. doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.105.
- Poole, K., Young, L., & Neshat, S. (1990). Enterobactin-mediated iron transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 172(12), 6991–6996. doi:10.1128/jb.172.12.6991-6996.1990.
- Samare Gholami, A., Sasan, H. A., Hashemabadi, M., & Ravan, H. (2019). Design and Construction of Recombinant CRISPR Vector Harboring LRRK2 Gene for Parkinson's Disease. *Cell and Tissue Journal*, 10(4), 214–225. doi :10.52547/JCT.10.4.214
- Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Severinov, K., Zhang, F., & Koonin, E. V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 15(3), 169–182. doi: 10.1038/nrmicro.2016.184.
- Wang, H., Cao, L., Logue, C. M., Barbieri, N. L., Nolan, L. K., & Lin, J. (2023). Evaluation of immunogenicity and efficacy of the enterobactin conjugate vaccine in protecting chickens from colibacillosis. *Vaccine*, 41(4), 930–937. doi:10.1016/j.vaccine.2022.12.057.
- Yogarathnam, V. (1995). Analysis of the causes of high rates of carcase rejection at a poultry processing plant. *The Veterinary Record*, 137(9), 215–217. doi:10.1136/vr.137.9.215.