مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱٤، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱٤۰٤
صفحه ۲۸۱-۲٦۹

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2026
Volume 14, Number 2, Pages: 269-281

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

10.61882/gebsj.14.2.4

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 Amiri[1], Mehdi Golchin*[1], Abbas Hajizade[2], Hamidreza Farzin[3], Majid Jamshidian-Mojaver[3]

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: * نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:
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

چکیده

رفرانس 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
URL: http://gebsj.ir/article-1-554-fa.html:

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]

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

خلاصه

کلی‌باسیلوز 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 حدت‌یافته را برجسته کرده است. هدف از این مطالعه، طراحی و ساخت ناقل نوترکیب CRISPR/Cas9 حامل gRNA اختصاصی ژن *entB* در *E. coli* سروگروه O2 به‌عنوان گامی اولیه در مسیر طراحی سویه تخفیف حدت‌یافته بود. در این مطالعه، gRNA اختصاصی علیه ژن *entB* با استفاده از پایگاه CHOPCHOP طراحی شد. الیگونوکلئوتیدهای رفت و برگشت مربوط به gRNA سنتز شده و پس از آنیلینگ (annealing)، درون پلاسمید pTargetF خطی‌شده با آنزیم BbsI، با استفاده از T4 DNA Ligase جایگذاری شدند. ناقل نوترکیب حاصل به سلول‌های مستعد DH5α منتقل شد و ورود قطعه gRNA به داخل وکتور با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و همچنین تعیین توالی تأیید گردید. نتایج نشان داد که توالی راهنمای طراحی‌شده با موفقیت در وکتور pTargetF کلون شده است. مشاهده باندهای مورد انتظار در آزمون PCR، صحت ساخت سازه نوترکیب را تأیید کرد. بر اساس یافته‌های این پژوهش، ناقل نوترکیب طراحی‌شده 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: *اشریشیا کلی*، سروگروه O2، CRISPR/Cas9، *entB*، gRNA، ناقل نوترکیب، کلی‌باسیلوز

مقدمه Introduction

سیستم Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated proteins (CRISPR-Cas) به عنوان یکی از پیشرفته ترین ابزارهای ویرایش ژنوم، انقلابی در زیست شناسی مولکولی و پزشکی ایجاد کرده است (Hryhorowicz *et al*.,2017; Hille *et al*., 2018). این سیستم که بر اساس مکانیسم ایمنی تطبیقی باکتری ها طراحی شده، از دو جزء کلیدی یعنی RNA راهنما (gRNA) و آنزیم اندونوکلئاز Cas9 تشکیل می شود؛ به گونه ای که gRNA با طراحی مکمل توالی هدف، آنزیم Cas9 را به ناحیه موردنظر ژنوم هدایت کرده و این آنزیم با ایجاد شکست های دورشته ای دقیق، امکان حذف، جایگزینی یا اصلاح توالی های ژنی را فراهم می آورد (Barrangou *et al*., 2007; Shmakov *et al*., 2017). علیرغم موفقیت های خیره کننده این فناوری در مدل های 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 می تواند منجر به جهش های ناخواسته و حتی پیامد های سرطانزایی در کاربردهای درمانی گردد (Mojica and Rodriguez-Valera., 2016; Hille *et al*., 2018). با وجود پژوهش های گسترده در زمینه بهینه سازی 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 توالی های ژنومی پیچیده تأثیر می گذارد و اغلب مطالعات موجود به بررسی این پارامترها در شرایط استاندارد آزمایشگاهی پرداخته اند، درحالیکه داده های کافی در مورد عملکرد این سیستم در بافت های خاص یا تحت شرایط استرس فیزیولوژیک در دسترس نیست(Barrangou *et al*., 2007; Loureiro and da Silva., 2019).

کلی‌باسیلوز 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]

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 مایکوپلاسمایی، 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 سیدروفورهایی مانند انتروباکتین، آئروباکتین 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 (Yogaratnam., 1995).

انتروباکتین 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 انتروباکتین، 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 نوترکیب pTargetF حمل‌کننده gRNA اختصاصی ژن *entB* برای سامانه CRISPR/Cas9 در *Escherichia coli* سروگروه O2 می باشد.

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.

CTGATGGGCGAAAAAAGCTGTGCTTATCTGGTGGTAAAAGAGCCGCTGCGCGCGGTGCAGGTGCGTCGTTTCCTGCGTGAACAGGGTATTGCC
GAATTTAAATTACCGGATCGCGTGGAGTGTGTAGATTCACTTCCGCTGACGGCGGTCGGTAAAGTCGATAAAAAACAATTACGTCAGTGGCTG
GCGTCACGCACATCAGCCTGAAGGAGAGAACACGATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACTGCCGGAGTCTCACGATATTCCGCAGA
ATAAAGTCGACTGGGCCTTTGAACCGCAACGTGCCGCGTTGTTAATCCATGATATGCAGGACTATTTTGTCAGCTTCTGGGGTGAGAACTGCCC
GATGATGGAGCAGGTGATCGCGAATATTGCGGCACTACGCGACTACTGCAAACAGCACAATATCCCGGTTTATTACACCGCCCAGCCGAAAG
AGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGGCCTGGCCTGACCCGTTCGCCGGAACAGCAAAAGGTGGTGGATCGCCTG
ACGCCAGATGCCGACGACACGGTGCTGGTGAAGTGGCGCTACAGCGCGTTTCATCGTTCCCCGCTGGAGCAAATGCTGAAAGAGAGTGGACG
TAACCAGCTGATTATTACCGGGGTATATGCCCACATTGGCTGTATGACCACCGCAACGGACGCATTTATGCGCGATATTAAACCGTTTATGGTG
GCGGATGCGCTGGCCGATTTCAGCCGTGACGAGCATTTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGGACGTTCTGGTCGGGTGGTGATGACCGAAGAA
TTGCTGCCAGCACCTATCCCCGCCAGCAAAGCGGAGCTGCGTGAGGTGATCCTGCCGTTGCTGGACGAGTCCGATGAACCCTTCGATGACGAC
AACCTGATCGACTACGGTCTGGATTCGGTGCGCATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGCGATATCGACTTTGTCATGCTG
GCGAAAAACCCGACCATCGACGCCTGGTGGAAGCTACTCTCCCGCGAGGTGAAATAATGGATTTCAGCGGTAAAAATGTCTGGGTAACTGGC
GCGGGGAAAGGTATCGGCTATGCCACGGCGCTGGCATTTGTTGAGGCGGGGGCGAAAGTTACAGG

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]

جدول ۱- توالی پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر ژن *entB*

Table 1. Sequences of primers designed for amplification of the *entB* gene

Primer name	Sequence (5′→3′)	Product size
entB-F	TGTGTAGATTCACTTCCGCTGA	1035 bp
entB-R	TGGCATAGCCGATACCTTTC	

طراحی gRNA اختصاصی ژن *entB*

به‌منظور طراحی gRNA اختصاصی برای هدف‌گیری ژن *entB*، توالی این ژن به‌عنوان ورودی در پایگاه CHOPCHOP وارد شد. طراحی gRNA بر اساس سامانه SpCas9 و توالی PAM به‌صورت 5′-NGG-3′ انجام گرفت. نهایی بر اساس معیارهایی مانند قرارگیری در ناحیه حفاظت‌شده ژن، امتیاز کارایی مناسب، اختصاصیت بالا و حداقل احتمال off-target انتخاب شد. در توالی هدف انتخاب‌شده، جایگاه PAM با توالی TGG در مجاورت ناحیه هدف قرار داشت. بر این اساس، دو الیگونوکلئوتید 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 شناسایی‌شده در ناحیه کدکننده و از روی رشته کدکننده طراحی گردید؛ بنابراین توالی آن (به‌جز جایگاه شناسایی) هم‌معنی با رشته کدکننده بوده و آنزیم را به سمت رشته الگو برای ایجاد برش هدایت می‌کند. توالی الیگونوکلئوتیدهای طراحی‌شده در جدول ۲ ارائه شده است.

Rank	Target sequence	Genomic location	Strand	GC content (%)	Self-complementarity	MM0	MM1	MM2	MM3	Efficiency
1	TAACCAGCTGATTATTACCGGGG	seq:649	+	40	0	1	0	0	0	75.10
2	CATATCATGGATTAACAACGCGG	seq:312	-	35	0	1	0	0	0	73.35
3	GGTGAAATAATGGATTTCAGCGG	seq:1069	+	35	0	1	0	0	0	73.11
4	GCCTGAAGGAGAGAACACGATGG	seq:202	+	55	1	1	0	0	0	73.02
5	TGGCTGTATGACCACCGCAACGG	seq:685	+	55	0	0	0	0	0	71.02
6	GTGGAAGCTACTCTCCCGCGAGG	seq:1048	+	65	0	1	0	0	0	69.84
7	ACCGGGGTATATGCCCACATTGG	seq:665	+	55	0	1	0	0	0	68.99
8	GCGACATCAAATGCTCGTCACGG	seq:766	-	50	0	1	0	0	0	65.70
9	AAATCCATTATTTCACCTCGCGG	seq:1063	-	35	0	1	0	0	0	64.91
10	GGTGGTCATACAGCCAATGTGGG	seq:678	-	50	0	1	0	0	0	63.88
11	GAACTGCCCGATGATGGAGCAGG	seq:364	+	60	0	1	0	0	0	63.60

شکل ۱- نمونه هایی برگرفته از مولکول راهنمای gRNA از پایگاه CHOPCHOP جهت استفاده در مطالعه و نمای شماتیکی 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]

جدول ۲- توالی الیگونوکلئوتیدهای gRNA طراحی‌شده برای هدف‌گیری 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) الیگونوکلئوتیدهای gRNA، خطی‌سازی پلاسمید pTargetF و لایگیشن (ligation)

برای تهیه قطعه دورشته‌ای gRNA، الیگونوکلئوتیدهای مکمل gRNA-F و gRNA-R در شرایط آنیلینگ قرار گرفتند. بدین منظور، واکنش آنیلینگ در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر از الیگونوکلئوتید gRNA-F، ۳ میکرولیتر از الیگونوکلئوتید gRNA-R، ٤ میکرولیتر NaCl 0.5 M و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه شد. مخلوط واکنش در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ترموسایکلر قرار گرفت و سپس میکروتیوب درون دستگاه باقی ماند تا به‌تدریج تا دمای اتاق سرد شود. قطعه دورشته‌ای حاصل برای مرحله لایگیشن با وکتور pTargetF خطی‌شده مورد استفاده قرار گرفت.

پلاسمید pTargetF مورد استفاده در این پژوهش از شرکت Addgene تهیه شد. به‌منظور وارد کردن قطعه gRNA در وکتور pTargetF، ابتدا پلاسمید با استفاده از آنزیم BbsI خطی‌سازی 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 سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شد. پس از پایان هضم آنزیمی، محصول واکنش روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و خطی‌شدن پلاسمید بر اساس مشاهده باند در اندازه مورد انتظار بررسی گردید.

پس از تأیید خطی‌شدن وکتور، قطعه دورشته‌ای gRNA حاصل از آنیلینگ به وکتور pTargetF خطی‌شده متصل شد. واکنش لایگیشن در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر وکتور خطی‌شده، ۲ میکرولیتر محصول آنیلینگ، ۱ میکرولیتر بافر 10X T4 DNA Ligase Buffer، 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 ١٦ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر انکوبه شد و سپس برای انتقال به سلول‌های مستعد DH5α مورد استفاده قرار گرفت.

انتقال ناقل نوترکیب به سلول DH5α

برای تهیه سلول‌های مستعد، سویه DH5α تهیه‌شده از شرکت NEB با روش شیمیایی مبتنی بر کلرید کلسیم (۱۰میلی مولار) آماده‌سازی شد (Gholami *et al*., 2002). به‌منظور انتقال ناقل نوترکیب، به میکروتیوب حاوی سلول‌های مستعد، ۷ میکرولیتر از محصول لایگیشن افزوده شد. به‌عنوان کنترل منفی، به میکروتیوب حاوی سلول‌های مستعد، به‌جای محصول لایگیشن، ۷ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شدند و سپس به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ٤٢ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بلافاصله پس از شوک حرارتی، میکروتیوب‌ها به مدت ۳ دقیقه روی یخ منتقل شدند.

در ادامه، به هر میکروتیوب ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع LB استریل اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار انکوبه شدند. پس از مرحله ریکاوری، میکروتیوب‌ها به مدت ۳ دقیقه در g× ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. سپس بخش عمده مایع رویی تخلیه شد و حدود ۱۵۰ میکرولیتر از آن در میکروتیوب باقی ماند. رسوب باکتریایی به‌آرامی در حجم باقی‌مانده مخلوط شد و کل حجم ۱۵۰ میکرولیتر روی محیط کشت جامد LB agar حاوی اسپکتینومایسین (غلظت نهایی ۸۰ میکروگرم ، سیگما)در میلی‌لیتر کشت داده شد. در نهایت، پلیت‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. رشد کلنی‌ها روی محیط حاوی اسپکتینومایسین به‌عنوان شاخص اولیه انتقال پلاسمید دارای ژن مقاومت در نظر گرفته شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]

تأیید PCR برای ورود قطعه gRNA به پلاسمید pTargetF

به‌منظور تأیید ورود قطعه gRNA به داخل پلاسمید pTargetF، واکنش Colony PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. برای تهیه DNA الگو، چند کلنی رشدکرده روی محیط انتخابی به‌صورت 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 به‌عنوان 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 طویل‌سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه بود. در پایان، طویل‌سازی 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 وکتورpTargetF

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	

نتایج و بحث
Results and Discussion

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 طراحی‌شده 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 بررسی‌شده 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 ٤٢٠، ٦٦٠ 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.

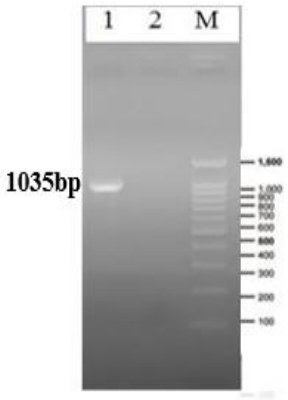
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]

Analysis Results #1: TGTGTAGATTCACTTCCGCTGA

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)	:	-4.53	kcal/mol
nmol/A_{260}	:	4.85		Hairpin (ΔG)	:	-0.43	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)	:	-1.01	kcal/mol
ug/A_{260}	:	32.82		Repeats (# of pairs)	:		kcal/mol
ΔG	:	-34.95	kcal/mol	Run (# of bases)	:	3	kcal/mol



شکل۲ - ویژگی‌های فیزیکی و ترمودینامیکی پرایمرهای *entB*-F و *entB*-R و تایید حضور ژن مربوط (چاهک۱: سروگروه مورد مطالعه حاوی ژن *entB* ، چاهک ۲: کنترل منفی (آب مقطر)، M:نشانگر bp ۱۰۰)

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).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]

```
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

lcl|NZ_CP126940.1_gene_3558     ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACTGCCGGAGTCTCATGATATTCCGCAGAAT   60
lcl|NZ_CP126926.1_gene_3633     ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACTGCCGGAGTCTCATGATATTCCGCAGAAT   60
lcl|NZ_CP126937.1_gene_3343     ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACTGCCGGAGTCTCATGATATTCCGCAGAAT   60
lcl|NZ_CP082772.1_gene_1450     ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACTGCCGGAGTCTCACGATATTCCGCAGAAT   60
lcl|NZ_CP109921.1_gene_3374     ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACTGCCGGAGTCTCACGATATTCCGCAGAAT   60
lcl|NZ_CP043181.1_gene_3808     ATGGCTATTCCAAAATTACAGGCTTACGCACTGCCGGAGCCTCATGATATTCCGCAGAAT   60
                                ************************************ **** ***************

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

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

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

lcl|NZ_CP126940.1_gene_3558     AAAGAGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGGCCTGGCCTGACC   300
lcl|NZ_CP126926.1_gene_3633     AAAGAGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGGCCTGGCCTGACC   300
lcl|NZ_CP126937.1_gene_3343     AAAGAGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGGCCTGGCCTGACC   300

lcl|NZ_CP082772.1_gene_1450     AAAGAGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGGCCTGGCCTGACC   300
lcl|NZ_CP109921.1_gene_3374     AAAGAGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGGCCTGGCCTGACC   300
lcl|NZ_CP043181.1_gene_3808     AAAGAGCAGAGCGATGAAGATCGGGCGCTGTTGAATGATATGTGGGGGCCTGGCCTGACC   300
                                ************************************************************

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

lcl|NZ_CP126940.1_gene_3558     CTGGTGAAATGGCGCTACAGCGCATTTCATCGTTCTCCGCTGGAGCAAATGCTCAAAGAG   420
lcl|NZ_CP126926.1_gene_3633     CTGGTGAAATGGCGCTACAGCGCATTTCATCGTTCTCCGCTGGAGCAAATGCTCAAAGAG   420
lcl|NZ_CP126937.1_gene_3343     CTGGTGAAATGGCGCTACAGCGCCATTTCATCGTTCTCCGCTGGAGCAAATGCTCAAAGAG   420
lcl|NZ_CP082772.1_gene_1450     CTGGTGAAATGGCGCTACAGCGCGTTTCATCGTTCCCCGCTGGAGCAAATGCTCAAAGAG   420
lcl|NZ_CP109921.1_gene_3374     CTGGTGAAATGGCGCTACAGCGCGTTTCATCGTTCCCCGCTGGAGCAAATGCTCAAAGAG   420
lcl|NZ_CP043181.1_gene_3808     CTGGTGAAGTGGCGCTACAGCGCGTTTCATCGTTCCCCGCTGGAGCAAATGCTCAAAGAG   420
                                ******** *************** *********** ************************

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

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

lcl|NZ_CP126940.1_gene_3558     TTCAGCCGTGACGAGCATTTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGGACGTTCTGGTCGGTTG   600
```

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]

```
lcl|NZ_CP126926.1_gene_3633     TTCAGCCGTGACGAGCATTTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGGACGTTCTGGTCGGGTG   600
lcl|NZ_CP126937.1_gene_3343     TTCAGCCGTGACGAGCATTTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGGACGTTCTGGTCGGGTG   600
lcl|NZ_CP082772.1_gene_1450     TTCAGCCGTGACGAGCATTTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGGACGTTCTGGTCGGGTG   600
lcl|NZ_CP109921.1_gene_3374     TTCAGCCGTGACGAGCATTTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGGACGTTCTGGTCGGGTG   600
lcl|NZ_CP043181.1_gene_3808     TTCAGCCGTGACGAGCATTTGATGTCGCTGAAATATGTGGCCGGACGTTCTGGTCGGGTG   600
                                ************************************************************

lcl|NZ_CP126940.1_gene_3558     GTGATGACCGAAGAATTGCTGCCAGCACCTATCCCCGCCAGCAAAGCGGCGCTGCGTGAG   660
lcl|NZ_CP126926.1_gene_3633     GTGATGACCGAAGAATTGCTGCCAGCACCTATCCCCGCCAGCAAAGCGGCGCTGCGTGAG   660
lcl|NZ_CP126937.1_gene_3343     GTGATGACCGAAGAATTGCTGCCAGCACCTATCCCCGCCAGCAAAGCGGCGCTGCGTGAG   660
lcl|NZ_CP082772.1_gene_1450     GTGATGACCGAAGAATTGCTGCCAGCACCTATCCCCGCCAGCAAAGCGGAGCTGCGTGAG   660
lcl|NZ_CP109921.1_gene_3374     GTGATGACCGAAGAATTGCTGCCAGCACCTATCCCCGCCAGCAAAGCGGAGCTGCGTGAG   660
lcl|NZ_CP043181.1_gene_3808     GTGATGAGCGAAGAATTGCTGCCAGCACCTATCCCCGCCAGCAAAGCGGAGCTGCGTGAG   660
                                ******* ************************************** **********

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

lcl|NZ_CP126940.1_gene_3558     TACGGTCTGGATTCGGTGCGGATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGC   780
lcl|NZ_CP126926.1_gene_3633     TACGGTCTGGATTCGGTGCGGATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGC   780
lcl|NZ_CP126937.1_gene_3343     TACGGTCTGGATTCGGTGCGGATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGC   780
lcl|NZ_CP082772.1_gene_1450     TACGGTCTGGATTCGGTGCGCATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGT   780
lcl|NZ_CP109921.1_gene_3374     TACGGTCTGGATTCGGTGCGCATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGT   780
lcl|NZ_CP043181.1_gene_3808     TACGGTCTGGATTCGGTGCGGATGATGGCGCTGGCGGCGCGCTGGCGCAAAGTGCATGGC   780
                                ******************* ************************************

lcl|NZ_CP126940.1_gene_3558     GATATCGACTTTGTCATGCTGGCGAAAAACCCGACCATCGACGCCTGGTGGAAGCTACTC   840
lcl|NZ_CP126926.1_gene_3633     GATATCGACTTTGTCATGCTGGCGAAAAACCCGACCATCGACGCCTGGTGGAAGCTACTC   840
lcl|NZ_CP126937.1_gene_3343     GATATCGACTTTGTCATGCTGGCGAAAAACCCGACCATCGACGCCTGGTGGAAGCTACTC   840
lcl|NZ_CP082772.1_gene_1450     GATATCGACTTTGTCATGCTGGCGAAAAACCCGACCATCGACGCCTGGTGGAAGCTACTC   840
lcl|NZ_CP109921.1_gene_3374     GATATCGACTTTGTCATGCTGGCGAAAAACCCGACCATCGACGCCTGGTGGAAGCTACTC   840
lcl|NZ_CP043181.1_gene_3808     GATATCGACTTTGTCATGCTGGCGAAAAACCCGACCATCGACGCCTGGTGGAAGCTACTC   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
                                ******************
```

شکل۳ - نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی ژن *entB* در شش سویه مختلف *Escherichia coli* سروگروه O2

Figure 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 اسپکتینومایسین 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 نوترکیب بود.

تأیید ورود قطعه gRNA به وکتور pTargetF با Colony PCR

نتایج حاصل از آنالیز الکتروفورزی محصولات PCR به منظور تأیید کلونینگ هر یک ازgRNA 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 کلونینگgRNA و باند ۱۵۰ جفت‌بازی با استفاده از پرایمرهای (gRNA- R / FpTarget vector) منظور اثبات کلونینگgRNA در باکتری *E. coli* مستعد مشاهده گردید. همچنین به منظور تأیید نهایی صحت کلونینگ، پلاسمید نوترکیب استخراج‌شده و برای تعیین توالی به شرکت پیشگام فرستاده شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbenchنسخه ۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنالیزها نشان داد که توالی gRNA کلون‌شده درون وکتور pTargetF

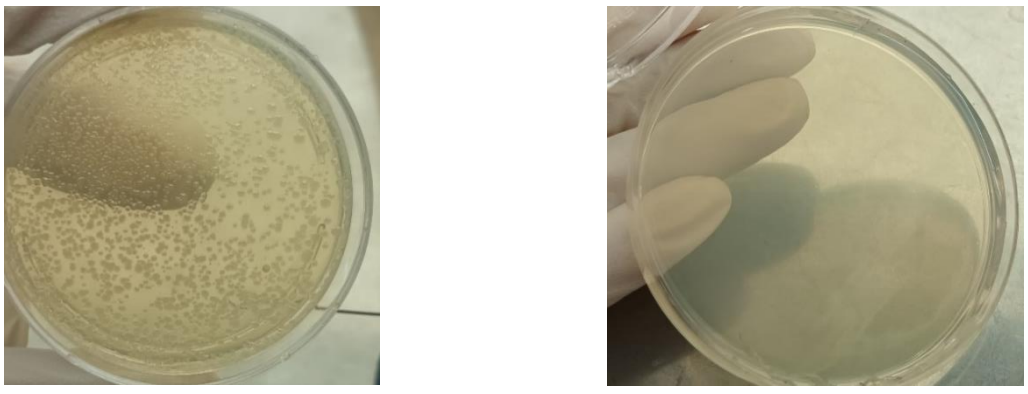
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]

دارای تشابه ٪۱۰۰ (صد در صد) با توالی مورد انتظار است. این یافته به طور قطعی موفقیت‌آمیز بودن فرآیند کلونینگ و ساخت سازه نوترکیب حاوی gRNA را تأیید می‌کند.

سامانه CRISPR/Cas9 به‌عنوان یکی از ابزارهای پرکاربرد در ویرایش ژنوم، به دلیل استفاده از مولکول راهنمای RNA برای شناسایی توالی هدف، نسبت به روش‌های پیشین مانند ZFN و TALEN از نظر طراحی ساده‌تر و انعطاف‌پذیرتر است (Kordzadeh-Kermani *et al*.,2023). در این سامانه، تغییر توالی هدف عمدتاً از طریق طراحی مجدد بخش راهنمای gRNA انجام می‌شود، در حالی که در روش‌هایی مانند ZFN و TALEN برای هر توالی هدف نیاز به طراحی پروتئین‌های اختصاصی وجود دارد (Chandrasegaran and Carroll., 2016; Hille *et al*.,2018) این ویژگی باعث شده است که CRISPR/Cas9 به ابزاری مناسب برای طراحی سامانه‌های هدفمند در مطالعات مهندسی ژنتیک باکتری‌ها تبدیل شود.

شکل ٤ - نتیجه برش آنزیمی وکتور .pTargetF چاهک ۱: نشانگر 1kb؛ چاهک ۲: وکتور pTargetF برش نخورده. چاهک۳: وکتور pTargetF خطی‌شده.

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.



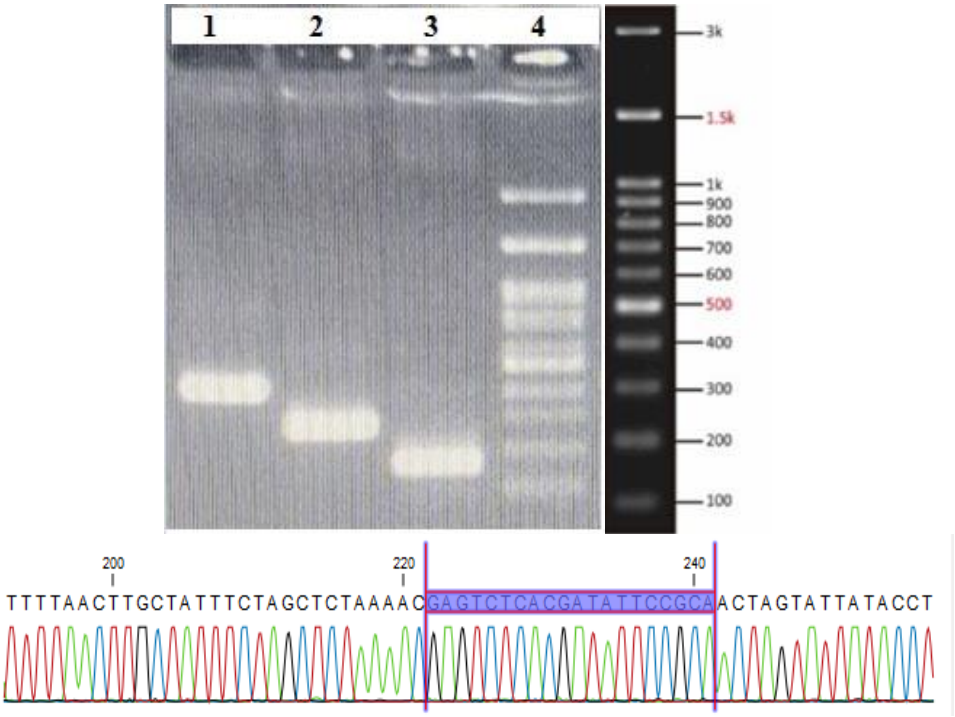
۱ ۲

شکل ۵- پلیت ۱: کلنی‌های حاصل از ترانسفورماسیون روی محیط کشت جامد حاوی اسپکتینومایسین؛ پلیت ۲: کنترل منفی.

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]



شکل ٦- تأیید PCR و تعیین توالی ورود توالی gRNA به درون وکتور .pTargetF چاهک ۱: محصول PCR با اندازه ٤۰۰ جفت‌باز؛ چاهک ۲: محصول PCR با اندازه ۲۷۰ جفت‌باز؛ چاهک ۳: محصول PCR با اندازه ۱۵۰ جفت‌باز؛ چاهک ٤: 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 نوترکیب pTargetF حامل gRNA اختصاصی ژن *entB* برای سامانه CRISPR/Cas9 طراحی و ساخته شد. انتخاب ژن *entB* به دلیل نقش آن در مسیر بیوسنتز انتروباکتین 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 (Yogaratnam., 1995; Gehring *et al*., 1998). از این نظر، ژن *entB* می‌تواند به‌عنوان 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 انتخاب‌شده در ناحیه‌ای حفاظت‌شده 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* سروگروه 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 حفاظت‌شده می‌تواند احتمال کاربردپذیری سازه طراحی‌شده را در سویه‌های مشابه افزایش دهد. با این حال، اثر تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده‌شده 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 اسپکتینومایسین 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]

باندهای مورد انتظار با اندازه‌های ٤٠٠، ٢٧٠ و ١٥٠ جفت‌باز نشان داد که قطعه gRNA در وکتور pTargetF قرار گرفته و سازه نوترکیب در سطح PCR تأیید شده است.

با وجود موفقیت در طراحی و ساخت ناقل نوترکیب، باید توجه داشت که نتایج این مطالعه محدود به مرحله ساخت و تأیید PCRی سازه است. در این پژوهش، انتقال سازه به سویه بیماری‌زای *E. coli* سروگروه O2، ایجاد جهش در ژن *entB*، بررسی حذف یا غیرفعال‌سازی ژن، و ارزیابی فنوتیپی کاهش جذب آهن یا کاهش حدت انجام نشده است. بنابراین، نمی‌توان بر اساس نتایج حاضر ادعا کرد که ژن *entB* غیرفعال شده یا بیماری‌زایی باکتری کاهش یافته است. برای تأیید عملکرد این سامانه، انجام آزمایش‌های تکمیلی از جمله تعیین توالی سازه نوترکیب، بررسی off-target، انتقال سازه به سویه هدف، تأیید جهش در ژن *entB*، بررسی رشد در شرایط کم‌آهن و ارزیابی فنوتیپی یا بیماری‌زایی ضروری است.

در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که طراحی و ساخت ناقل نوترکیب pTargetF حامل gRNA اختصاصی ژن *entB* با موفقیت انجام شده است. این سازه می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مقدماتی برای مطالعات بعدی در زمینه هدف‌گیری ژن *entB* و بررسی نقش آن در جذب آهن و تخفیف حدت سویه‌های بیماری‌زای *Escherichia coli* طیور مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به افزایش نگرانی‌ها درباره مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های باکتریایی، توسعه ابزارهای ژنتیکی هدفمند مانند CRISPR/Cas9 می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات آینده برای طراحی راهکارهای جایگزین در کنترل عفونت‌های باکتریایی باشد (Hryhorowicz *et al*., 2017; Wang *et al*., 2023).

نتیجه‌گیری کلی: براساس نتایج این پژوهش، gRNA اختصاصی ژن *entB* با موفقیت طراحی و در وکتور pTargetF کلون شد. تأیید PCR سازه نوترکیب نشان داد که قطعه gRNA در وکتور موردنظر قرار گرفته است. این سازه می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مقدماتی برای مطالعات بعدی در زمینه هدف‌گیری ژن *entB*، بررسی کارایی ویرایش ژنی و ارزیابی نقش این ژن در تخفیف حدت سویه‌های بیماری‌زای *Escherichia coli* طیور مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، تأیید عملکرد این سامانه نیازمند انجام آزمون‌های تکمیلی از جمله تعیین توالی سازه، انتقال به سویه هدف، بررسی ایجاد جهش در ژن *entB* و ارزیابی فنوتیپی در شرایط کم‌آهن است.

منابع

References

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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]
[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]

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: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.

Yogaratnam, 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-18]

[DOI: 10.61882/gebsj.14.2.4]