

## کلونینگ توالی‌های ۵' و ۳' ژن SipA سالمونلا انتروتیدیس در باکتری *E. coli*

گزینه شیرازی<sup>۱</sup>، عباس دوستی<sup>۲\*</sup>

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

\* نویسنده مسئول:

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۷

### چکیده

عفونت‌های سالمونلایی در تمامی نقاط دنیا در میزبان‌های بسیاری همچون حیوانات اهلی، وحشی و انسان باعث بروز بیماری می‌شوند. توانایی وارد شدن و زنده ماندن در سلول‌های میزبان شرط لازم برای بیماری زایی گونه‌های سالمونلا است. پروتئین تهاجمی سالمونلا یک فاکتور بیماری زایی مهم است که توسط باکتری به سلول‌های میزبان منتقل می‌شود. این مطالعه با هدف کلون سازی نواحی ۵' و ۳' ژن SipA سالمونلا انتروتیدیس و شناسایی آن در باکتری اشیریشیا کلی انجام گرفت. در این تحقیق توالی‌های ۵' و ۳' ژن SipA به کمک پرایمرهای اختصاصی آن‌ها و روش PCR تکثیر گردید. سپس هر کدام از این توالی‌ها به روش T/A Cloning در حامل pGEM-T easy کلون و سپس به باکتری اشیریشیا کلی منتقل گردید. با استفاده از روش PCR قطعات مربوط به هر ناحیه تکثیر و تایید گردید. نتایج مرحله بعد نیز نشان دهنده ی کلون سازی موفقیت آمیز ژن مورد نظر در باکتری اشیریشیا کلی بود. تایید نهایی قطعات مربوط به هر ناحیه با استفاده از آنزیم‌های XbaI, BglIII, SacI, XhoI انجام گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه به نظر می‌رسد که می‌توان با قرار دادن یک ژن مقاومت به آنتی بیوتیک مانند کانامایسین در این ناحیه ژنی سازواره ای ایجاد کرد که ژن مورد نظر را حذف کند و بتوان آن را به عنوان کاندیددی جهت تولید واکسن ژنی علیه سالمونلوزیس در تحقیقات آینده مورد استفاده قرار داد.

**واژگان کلیدی:** سالمونلا انتروتیدیس؛ اشیریشیا کلی؛ کلون سازی؛ ژن SipA

### مقدمه

سالمونلا انتریکا سرووار انتروتیدیس می‌باشد. این گونه فاقد اسپور است و توسط فلاژل‌های اطراف حرکت می‌کند. این باکتری از عوامل بیماری سالمونلوزیس در پرندگان می‌باشد که قابل انتقال به انسان بوده و در زمره مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان قرار می‌گیرد (Safari et al., 2013). این باکتری دارای دو نوع تاژک است که در اتصال سالمونلا انتروتیدیس به سلول‌های اپیتلیال روده کوچک و دهان دخالت دارند (Safari et al., 2013; Fadl et al., 2013).

باکتری سالمونلا یک باکتری میله‌ای شکل گرم‌منفی از خانواده انتروباکتریاسه و عامل یکی از شایع‌ترین عفونت‌های غذایی می‌باشد، که باعث طیف گسترده‌ای از بیماری‌های انسان از جمله تب روده‌ای، اسهال، استفراغ، ورم معده و روده می‌شود (Bennasar et al., 2000). ۲۲۰۰ نوع از این باکتری تاکنون کشف شده است که در چند گونه تقسیم می‌شوند. یکی از این گونه‌ها سالمونلا انتروتیدیس است که نام کامل آن

که توسط سیستم ترش‌چی نوع سه به سلول‌های میزبان انتقال می‌یابد. این پروتئین در سلول میزبان به رشته‌های اکتین متصل می‌شود، پلی‌مریزاسیون رشته‌های اکتین را افزایش می‌دهد و پروتئین‌های ناپایدار اکتین افرا خنثی می‌کند. این امر منجر به نوآرایی سیستم سیتواسکلتال می‌شود که در نهایت اجازه می‌دهد تا عامل بیماری‌زا به سلول میزبان وارد شود (Dong et al., 2011). غیرفعال کردن ژن *SipA* باعث می‌شود که یک وقفه‌ی کوتاه (۵ دقیقه) در نحوه‌ی تهاجم باکتری *سالمونلا/انتریکا* به داخل سلول‌های اپیتلیال بوجود بیاید (Jepson et al., 2001). در نهایت ژن *SipA* موجب القا بسته‌بندی اکتین می‌شود، واسطه‌های گلسولین اکتین را دپلی‌مریزه می‌کند و باعث فعالیت ژن *SipC* نیز می‌شود (Dai et al., 2004). نبود ژن‌هایی همچون *SipA* و *SopE* در گونه‌های *سالمونلا* روی آلوده شدن سلول‌های اپیتلیال میزبان توسط باکتری تاثیر می‌گذارد و میزان آلودگی و عفونت را به شدت کاهش می‌دهد (Alvarez et al., 2004). هدف از این مطالعه کلون کردن توالی‌های ۵' و ۳' ژن *SipA* *سالمونلا* انتریتیدیس در باکتری *E. coli* جهت ساخت سازواره ژنی برای حذف این ژن و کاهش قدرت بیماری‌زایی آن است.

### مواد و روش کار

باکتری *سالمونلا* انتریکا سرووارانتریتیدیس (سویه استاندارد) از بخش میکروبیولوژی انیستیتو پاستور ایران، تهیه شد. هم چنین باکتری اشیریشیا کلی سویه Top10 که برای اهداف کلون سازی ژن و تکثیر پلاسمیدهای نو ترکیب مورد استفاده است، از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تهیه گردید.

استخراج DNA ژنومی

DNA ژنومی از باکتری *سالمونلا* انتریتیدیس استخراج شد. برای این منظور از کیت استخراج DNA، شرکت سیناژن ایران

(1995). توانایی وارد شدن و زنده ماندن در سلول‌های میزبان شرط لازم برای بیماری‌زایی گونه‌های *سالمونلا* است. از جمله سلول‌هایی که به طور طبیعی فاگوسیت نیستند می‌توان سلول‌های اپیتلیال روده را نام برد (Finlay et al., 1990). از بین سروتیپ‌های مختلف *سالمونلا*، سروتیپ‌های اینتریتیدیس و تیفی موریوم در مقام اول عفونت غذایی قرار دارند و دارای شیوع گسترده‌ای در آسیا (کره، ژاپن و تایلند و...) می‌باشند (Solhan et al., 2011). اولین گزارش مربوط به شیوع مسمومیت غذایی ناشی از *سالمونلا*، در سال ۱۸۸۸ در آلمان بود. در مطالعات متعدد، شیوع آن از ۲/۷۴٪ آمریکا تا ۸/۳٪ در ایران گزارش شده است (Jamshidi et al., 2009). محصولات از جمله مرغ، گوشت گاو، گوشت خوک، ماهی، شیر، تخم مرغ منشاء *سالمونلوزیس*‌های ناشی از مواد غذایی می‌باشند (Saroj et al., 2008). تهاجم *سالمونلا*، به یک منطقه‌ی ۴۰ کیلو بازی روی کروموزوم بستگی دارد که در منطقه‌ی سانتی‌زوم ۶۳ واقع شده و جزایر بیماری‌زایی *سالمونلا* نامیده می‌شود (Hueck, 1998). ژن-هایی که در منطقه‌ی *SPI-1* قرار دارند یک سیستم پروتئینی ترش‌چی نوع سه و چندین پروتئین موثر و چاپرون‌ها را رمزگذاری می‌کنند. مانند بسیاری از پاتوژن‌های باکتریایی، گونه‌های *سالمونلا* از این سیستم ترش‌چی نوع سه برای تزریق پروتئین‌های ویروانس به داخل سلول‌های میزبان استفاده می‌کنند. بنابراین *سالمونلا* به داخل سیتوپلاسم سلول میزبان منتقل می‌شود و ماشین سلولی میزبان را سرنگون می‌کند (Lilic et al., 2003). بخشی از کروموزوم این باکتری پروتئینی را کد می‌کند بنام پروتئین تهاجمی *سالمونلا*-ژن *SipA* که منجر به ساخته شدن این پروتئین می‌شود حاوی ۶۸۵ آمینواسید می‌باشد. در مرحله اول آلودگی ژن *SipA* برای بهتر وارد شدن باکتری *سالمونلا* به سلول میزبان نیاز است. پروتئین تهاجم *سالمونلا* یک فاکتور بیماری‌زایی است

در این تحقیق توالی‌های کامل ۵' و ۳' ژن SipA سالمونلا انتریتیدیس با کمک واکنش زنجیره‌ای پلی مرز تکثیر گردید. به این ترتیب که ابتدا ناحیه ۵' ژن SipA با استفاده از پرایمرهای زیر تکثیر شد.

*SipA-up-F: 5'- TATTCTAGAGTTATGTCGTCACCGTTG -3' XbaI*

*SipA-up-R: 5'- CGTAGATCTTATCCTCTTCTGTTATCC -3' Bgl II*

شده است، قرار گرفت. محصول واکنش تکثیری برابر ۳۱۰ جفت باز بود. سپس ناحیه ۳' ژن Sip A با استفاده از پرایمرهای زیر تکثیر شد.

*SipA-down-F: 5'- ATAGAGCTCAAATGCGGGAAAGACG -3' SacI*

*SipA-down-R: 5'- CACCTCGAGCATAACAAGATTCGTC -3' XhoI*

مدت ۱ دقیقه جهت طویل شدن رشته‌ها، و در نهایت دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه جهت طویل شدن نهایی انجام گرفت. برای خنک شدن دستگاه هم یک دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به دستگاه داده شد.

استخراج DNA از ژل

محصولات واکنش PCR به ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل شد و در دستگاه الکتروفورز قرار داده شد. قطعات DNA مربوط به ناحیه ۵' ژن SipA و ناحیه ۳' آن پس از مشاهده در دستگاه UVdoc با استفاده از تیغ اسکالپل از ژل جداسازی شدند و به کمک کیت استخراج DNA از ژل (BIONEER) ساخت کشور کره مطابق با دستورالعمل کیت، تخلیص شدند. به منظور صحت قطعات ژنی تخلیص شده و کیفیت آن‌ها، مقدار ۳ میکرولیتر از هر کدام از ژن‌ها روی ژل آگارز ۱/۵ درصد قرار داده شد و در کنار مارکر الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

انجام T/A Cloning

(DNPTM KIT) استفاده شد. کیفیت DNA تخلیص شده، پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت (Sambrook and Russell, 2001).

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز

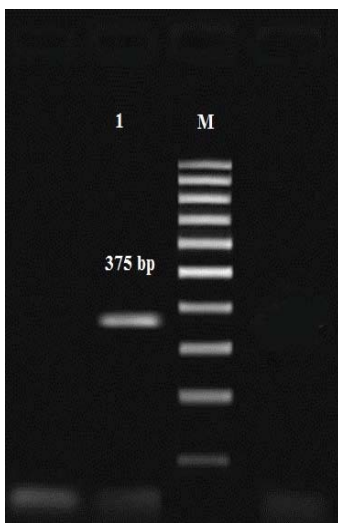
برای تسهیل کلون سازی، در نزدیکی سر ۵' هر یک از پرایمرهای SipA-up-F و SipA-up-R به ترتیب سایت برش آنزیم‌های XbaI و Bgl II که با کشیدن خط زیر آن مشخص

برای تکثیر ناحیه انتهایی ژن SipA از پرایمرهای SipA-up-F و SipA-up-R که به ترتیب واجد سایت‌های برش آنزیمی SacI و XhoI می‌باشد، استفاده شد. طول محصول PCR در این واکنش برابر ۳۷۵ جفت باز بود.

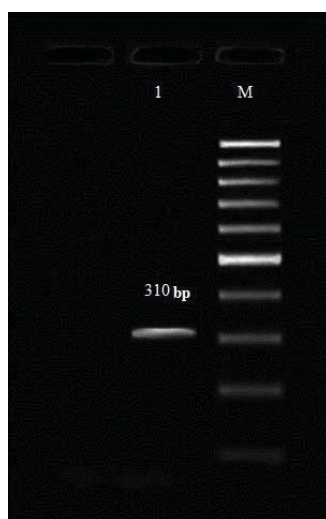
واکنش PCR با حجم نهایی میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول dNTPMix، ۱/۵ میکرومول MgCl<sub>2</sub>، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR و ۱ واحد آنزیم Smart Taq DNA Polymerase انجام گردید. هم چنین به منظور جلوگیری از آلودگی و تبخیر، ۲ تا ۳ قطره روغن معدنی استریل به مخلوط واکنش اضافه گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندرف ساخت کشور آلمان با شرایط دمایی ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، جهت باز شدن ابتدایی رشته‌های DNA. سپس ۳۲ چرخه که شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه جهت باز شدن کامل دو رشته، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ناحیه ۵' و دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد برای ناحیه ۳' جهت اتصال پرایمرها به رشته DNA، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به

میکروگرم در هر میلی لیتر آمپی سیلین کشت داده شدند. از کلنی‌های حاصل با استفاده از کیت شرکت Qiagen ساخت کشور آمریکا تخلیص پلاسمید انجام گرفت. با کمک آنزیم‌های مربوط به هر ناحیه ژن مورد نظر از پلاسمید جدا شد و در نهایت تایید اولیه صحت کلونینگ به روش PCR و هضم آنزیمی صورت گرفت.

برای این منظور محصولات PCR تخلیص شده از ژل، با استفاده از کیت شرکت pGEM T/A Cloning Invitrogen Kit ساخت کشور آمریکا کلون شدند. محصولات الحاق شد (Ligation) در باکتری اشریشیا کلی سویه Top10 به روش شیمیایی و با استفاده از CaCl<sub>2</sub> ترانسفورم شدند و باکتری‌های مذکور در محیط آگاردار Luria-Bertani محتوی ۱۰۰



شکل ۱: ژل حاصل از کلون شدن ژن *SipA-up* در وکتور pGEM شماره ۱: باند حاصل از کلون شدن ژن *SipA-up* M: مارکر ۱۰۰ bp



شکل ۲: ژل حاصل از کلون شدن ژن *SipA-down* در وکتور pGEM شماره ۱: باند حاصل از کلون شدن ژن *SipA-down* M: مارکر ۱۰۰ bp



شکل ۳: ژل حاصل از برش ژن *SipA-up* از وکتور pGEM شماره ۱: باند حاصل از هضم آنزیمی ژن *SipA-up* با آنزیم‌های *XbaI/BglII*: M: مارکر ۱ Kb



شکل ۴: ژل حاصل از برش ژن *SipA-down* از وکتور pGEM شماره ۱: باند حاصل از هضم آنزیمی ژن *SipA-down* با آنزیم‌های *SacI/XhoI*: M: مارکر ۱ Kb

ژنتیک نامیدند که به علت داشتن فرآیندهایی مانند همسانه‌سازی و کلون‌سازی ژن، دوره درخشان دیگری را برای علم ژنتیک رقم زدند (Desin et al., 2009). سالمونلا انتریکا یکی از مهم‌ترین عامل گاستروانتریت اپیدمیک و آندمیک در انسان در سراسر جهان می‌باشد (Betancor et al., 2004). ژن *SipA* در اپرون

#### بحث

سال‌های ۱۹۷۱ تا ۱۹۷۳ را به عنوان یک دگرگونی در بیولوژی مدرن نام می‌برند و انقلابی در زیست‌شناسی تجربی به وجود آمد. روشی ابداع شد که کارهای غیرممکن گذشته را، اگرچه به سختی ولی با موفقیت، قابل طراحی و انجام‌پذیر کرد. این روش‌ها را فن‌آوری DNA نوترکیب یا مهندسی

بازسازی میکروگراف‌های الکترون از رشته‌های اکتین و سپس انجام مدل سازی و جهش زایی بر روی ساختار آن، نشان دادند که ژن SipA به عنوان یک جز اصلی مولکولی در ایجاد ثبات رشته‌های اکتین دخالت دارد (Lilic et al., 2003). روسو و همکاران در سال ۲۰۰۷ پی بردند که حذف ژن *crp* موجب تولید واکسن علیه سالمونلا می‌شود (Rosu et al., 2007). پانگ و همکاران در سال ۲۰۱۱ حذف‌هایی را در باکتری سالمونلا انتریتیدیس در زیرواحد E1 پیرووات دهیدروژناز روی ژن ace E انجام دادند که منجر به کاهش گونه‌های باکتری در یک مدل از مرغ‌ها شد (Pang et al., 2011). در این تحقیق کلون سازی نواحی ۵' و ۳' ژن SipA باکتری سالمونلا انتریتیدیس در *E. coli* انجام شد.

#### نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر کلون سازی موفقیت آمیز توالی‌های ۵' و ۳' ژن SipA در باکتری اشرشیا کلی جهت شناسایی ژن مورد نظر و تاثیر آن در چگونگی روند بیماری-زایی باکتری را نشان داد. بنابراین به نظر می‌رسد که می‌توان با قرار دادن یک ژن مقاومت به آنتی بیوتیک مانند کانامایسین در بین نواحی ۵' و ۳' ژن مورد نظر سازواره‌ای تولید کرد که به عنوان واکسن ژنی در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

#### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله تشکر و سپاس خود را از حوزه معاونت پژوهشی و همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل حمایت‌های علمی و مالی اعلام می‌دارد.

SipBCDA قرار دارد. یک جهش در ژن SipA به طور قابل توجهی حمله‌ی باکتری سالمونلا انتریکا را به داخل سلول‌های اپیتلیال کم کرد. بنابراین مشخص شد که پروتئین رمزگذاری شده توسط ژن SipA میزان تهاجم باکتری را با مکانیسم ویژه خود بالا می‌برد (Zhou et al., 1999). نتایج تحقیقی در کشور اسپانیا حاکی از آن است که بعد از سالمونلا تیفی موریوم شایع‌ترین عامل سالمونلوزیس، سالمونلا انتریتیدیس می‌باشد (Alvarez et al., 2004). بر پایه‌ی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ در ایران روی نمونه‌های حاصل از کشت مدفوع مرغ انجام شد، از ۸۰ نمونه مورد بررسی ۱۱ درصد آلوده به باکتری سالمونلا انتریتیدیس تشخیص داده شدند (Jafari et al., 2007). هارت و همکاران در سال ۱۹۹۸ مطالعاتی را روی حذف ژن‌های SipA و *SopE* انجام دادند، و مشاهده کردند که نبود این ژن‌ها روی آلوده شدن سلول‌های اپیتلیال میزبان توسط باکتری تاثیر می‌گذارد و آن را به شدت کاهش می‌دهد (Hardt et al., 1998). هیگاشید و همکاران در سال ۲۰۰۲ آزمایشاتی را جهت آنالیز ژن SipA در داخل بدن موجود زنده‌ای که به سالمونلا آلوده شده بود، انجام دادند و مشاهده کردند که بیان این ژن روی رشته‌های محیطی اکتین تاثیر می‌گذارد و میزان پلی مریزاسیون آن‌ها را افزایش می‌دهد. در این آزمایش مشخص شد که در سلول‌های آلوده به سالمونلا که در ژن SipA دچار جهش شده بودند میزان آلودگی حدود ۸۰ درصد کاهش یافته بود (Higashide et al., 2002). در مطالعه‌ای دیگر لیلیک و همکاران در سال ۲۰۰۳ به کمک کریستالوگرافی اشعه X از ژن SipA و

1. Alvarez, J., Sota, M., Vivanco, A.B., Perales, I., Cisterna, R., Rementeria, A., and Garaizar, J. 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *J Clin Microbiol.* 42: 1734-1738.
2. Bennasar, A., de Luna, G., Cabrer, B., and Lalucat, J. 2000. Rapid identification of *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* and *S. virchow* isolates by polymerase chain reaction based fingerprinting methods. *Int Microbiol.* 3: 31-38.
3. Betancor, L., Schelotto, F., Martinez, A., Pereira, M., Algorta, G., Rodriguez, M.A., Vignoli, R., and Chabalgoity, J.A. 2004. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* isolates collected from humans and Poultry in Uruguay. *J Clin Microbiol.* 42: 1155-1162.
4. Dai, S., Sarmere, P.D., Wiggan, O., Bamburg, J.R., and Zhou, D. 2004. Efficient *Salmonella* entry requires activity Cycles of host ADF and Cofilin. *Cell Microbiol.* 6: 459-471.
5. Desin TS, Lam PS, Koch B, Mickael C, Berberov E, Wisner AL, Townsend HG, Potter AA, Ko"ster W. 2009. *Salmonella enterica* Serovar *Enteritidis* Pathogenicity Island 1 Is Not Essential for but Facilitates Rapid Systemic Spread in Chicken. *Infe Immun.* 77: 2866-2875.
6. Dong, H., Peng, D., Jiao, X., Zhang, X., Geng, S.H., and Liu, X. 2011. Roles of the *spiA* gene from *Salmonella enteritidis* in biofilm formation and virulence. *Microbiology.* 157: 1798-1805.
7. Fadl, A.A., Nguyen, A.V., and Khan, M.I. 1995. Analysis of *Salmonella enteritidis* isolates by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol.* 33: 987-989.
8. Finlay, B.B., and Falkow, S. 1990. *Salmonella* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *J Infect Dis.* 162: 1096-1106.
9. Hardt, W.D., Urlaub, H., and Galan, J.E. 1998. A Substrate of the centisome 63 type III protein secretion system of *salmonella typhimurium* is encoded by a cryptic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 2574-2579.
10. Higashide, W., Dai, S.H., Hombs, V.P., and Zhou, D. 2002. Involvement of *sipA* in modulating actin dynamics during *salmonella* invasion into cultured epithelial cells. *Cell Microbiol.* 4: 357-365.
11. Hueck, C.J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 379-433.
12. Jafari, R.A., Ghorbanpour, M., and Jaideri, A. 2007. An investigation into *Salmonella* infection status in backyard Chickens in Iran. *Int Poult Sci.* 6: 227-229.

13. Jamshidi, A., Bassami, M.R., Afshari-Nic, S. 2009. Identification of *Salmonella* spp. and *Salmonella typhimurium* by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran. *Int J Vet Res.* 3: 43-48.
14. Jepson, M.A., Kenny, B., and Leard, A.D. 2001. Role of *sipA* in the early stages of *Salmonella* typhimurium entry into epithelial cells. *Cell Microbiol.* 3: 417-426.
15. Lilic, M., Galkin, V.E., Orlova, A., Vanloock, M.S., Egelman, E.H., and Stebbins, C.E. 2003. *Salmonella SipA* polymerizes actin by stabilizing filaments with nonglobular protein arms. *Science.* 301: 1918-1921.
16. Pang, E., Tien-Lin, C., Selvaraj, M., Chang, J., and Kwang, T. 2011. Deletion of the *aceE* gene (encoding a component of pyruvate dehydrogenase) attenuates *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 63: 108-118.
17. Rosu, V., Chadfield, M.S., Santona, A., Christensen, J.P., Thomsen, L.E., Rubino, S., and Olsen, J.E. 2007. Effects of *crp* deletion in *salmonella enterica* serotype gallinarum. *Acta Vet Scand.* 49: 14.
18. Safari Foroshani, N., Karami, A., and Pourali, F. 2013. Simultaneous and Rapid Detection of *Salmonella typhi*, *Bacillus anthracis*, and *Yersinia pestis* by Using Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR). *Iran Red Crescent Med J.* 15: e9208.
19. Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual.* New York, USA.
20. Saroj, S.D., Shashidhar, R., Karani, M., Bandekar, J.R. 2008. Rapid, sensitive, and validated method for detection of *Salmonella* in food by an enrichment broth culture - nested PCR combination assay. *Mol Cell Probes.* 22: 201-206.
21. Solhan, S., Chan, P.P., Kurupatham, L., Foong, B.H., Lim Ooi, P., James, L., Phua, L., Ling Tan, A., Koh, D., Tai Goh, K. 2011. An outbreak of gastroenteritis caused by *Salmonella enterica* serotype Enteritidis traced to cream cakes. *W P S A R.* 2: 23-30.
22. Zhou, D., Mooseker, M.S., and Galan, J.E. 1999. An invasion-associated *Salmonella* protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(10): 10176-10181.



## Cloning and sequencing 5' and 3' SipA gene of *Salmonella enteritidis* in *E. coli*

Gazizeh Shirazi<sup>1</sup>, Abbas Doosti\*<sup>2</sup>

<sup>1</sup> M. Sc. Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord Iran.

<sup>2</sup> Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

\*Corresponding author:

Received: 09 February 2016

Accepted: 28 May 2015

### Abstract

*Salmonella* infections in many domesticated animals, wildlife and humans cause disease all of the world. The ability to enter and survive in host cells is a prerequisite for pathogenicity species of *Salmonella*. *Salmonella* invasion protein is an important virulence factors into host cells by bacteria transmitted. In this study we showed cloning the 5' and 3' gene *SipA* *Salmonella* and was performed in *E. coli*. In this study, by PCR and specific primers sequences of 5' and 3' *SipA* gene was amplified correctly. DNA fragment was cloned by T/A cloning technique in pGEM T-easy vector and transformed into *E. coli*. Cloning of *SipA* gene was confirmed by PCR. The results of next step showed that the *SipA* gene was successfully cloned in *E. coli*. Final confirmation of construct was done by *Xba*I, *Bgl*II, *Sac*I, *Xho*I restriction enzymes. According to the results that, insertion of antibiotic-resistant genes between 5' and 3' regions of the *SipA* gene of *Salmonella enteritidis* due to gene deletion in the bacteria. The construct's gene can be used as a target for gene vaccines against *Salmonella enteritidis* in the future.

**Key words:** *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, Cloning, *SipA* gene.