

The effect of the intrinsic resistance of *Shigella flexneri* 2a to spectinomycin on the efficiency of the CRISPR/Cas9 system

Elaheh Kazemipour

MSc, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: Kazemipour.elaheh@gmail.com

Hosseinali Sasan 

*Corresponding Author: Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: hsasa@uk.ac.ir

Mohammadreza Mohammadabadi 

Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran. E-mail: mrm@uk.ac.ir

Abstract

Objective

Targeted gene editing in pathogenic bacteria such as *Shigella flexneri* 2a using the advanced CRISPR/Cas9 system is a significant step in developing genetic tools and novel therapeutic strategies. However, the success of this process heavily relies on the precise selection of recombinant clones, typically through suitable antibiotic markers. In the current study, we evaluated the efficacy of antibiotic markers (spectinomycin and kanamycin) in pTargetF:gRNA-*pic* and pEcCas plasmids in the clinical strain of *Shigella flexneri* 2a.

Materials and methods

First, the target region of the *pic* gene (a crucial virulence factor in *Shigella*) was identified. Based on this sequence, gRNA guide sequences, specific primers, and homologous recombination arms (HDR arms) were meticulously designed. Subsequently, targeted sgRNA cloning to the *pic* gene in the pTargetF plasmid was performed, and the plasmid's structural integrity was confirmed using PCR and sequencing methods. Next, the successful introduction of the pEcCas plasmid into *Shigella flexneri* 2a cells was achieved via heat shock. Following this, the recombinant pTargetF plasmid, along with HDR arms, was transferred into bacteria containing the pEcCas plasmid using electroporation. Initial selection of transformed clones during the cloning stage on LB media

containing kanamycin was successful. To investigate potential antibiotic alternatives, the wild-type *Shigella flexneri* 2a strain was also cultured on media containing chloramphenicol, ampicillin, and streptomycin.

Results

After electroporation and culturing of recombinant and wild-type (control) strains on media containing spectinomycin and kanamycin, the entire surface of the plates was covered with uniform bacterial growth, making the differentiation of recombinant clones impossible. This inability to differentiate resistant clones clearly indicates the intrinsic or widespread resistance of the *Shigella flexneri* 2a strain to spectinomycin. Furthermore, indiscriminate and widespread bacterial growth was observed in the wild-type strain when cultured on media containing chloramphenicol, ampicillin, and streptomycin, confirming the intrinsic resistance of this strain to several common antibiotics.

Conclusions

These findings highlight that, in this particular strain, the use of spectinomycin as a selection marker is inappropriate. For successful editing of pathogenic genes in similarly resistant strains, it is recommended to employ alternative selection markers to which the bacterium is sensitive (such as kanamycin), or to utilize markerless systems. Moreover, conducting preliminary antibiotic susceptibility testing (even in a simplified form) is essential prior to any molecular cloning or genome editing procedures.

Keywords: Antibiotic resistance, CRISPR/Cas9, Genetic manipulation, *Shigella flexneri* 2a, Spectinomycin.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Kazempour, E., Sasan, H., Mohammadabadi, M. (2025). The effect of the intrinsic resistance of *Shigella flexneri* 2a to spectinomycin on the efficiency of the CRISPR/Cas9 system. *Agricultural Biotechnology Journal*, 17(3), 177-200.

Agricultural Biotechnology Journal, 17(3), 177-200.

DOI: 10.22103/jab.2025.25382.1717

Received: May 20, 2025.

Received in revised form: July 07, 2025.

Accepted: July 08, 2025.

Published online: August 30, 2025.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian

Biotechnology Society.



© the authors

Introduction

Shigella flexneri, a gram-negative, non-motile, facultative anaerobe, is a major causative agent of shigellosis, a severe intestinal infection that leads to epithelial damage, mucosal inflammation, and bloody diarrhea. Among various serotypes, *Shigella flexneri* 2a is the most prevalent in developing countries. This strain has shown increasing levels of multidrug resistance (MDR), complicating treatment options and hindering molecular genetic interventions, such as CRISPR/Cas9-based genome editing. One of the critical genes involved in the virulence of *Shigella flexneri* 2a is the *pic* gene, located on a pathogenicity island (PAI-1) on the bacterial chromosome. This gene encodes a serine protease autotransporter, which plays an essential role in mucin degradation and pathogenesis by facilitating bacterial access to the colonic epithelium. Genome editing technologies, especially CRISPR/Cas9, offer precise and efficient manipulation of bacterial genomes. However, the success of such gene editing relies heavily on the selection of transformed clones using effective antibiotic resistance markers. A common challenge arises when the host bacterium, such as *S. flexneri* 2a, exhibits intrinsic resistance to the antibiotic used for selection, thus limiting the system's efficiency. Spectinomycin is frequently employed as a selective marker in CRISPR vectors like pTargetF. Still, its effectiveness in certain bacterial strains remains uncertain due to potential resistance mechanisms. In many CRISPR workflows, the selection marker plays a decisive role in determining transformation success, particularly in bacteria with unpredictable drug-resistance profiles. Therefore, the choice of antibiotic marker must be not only vector-compatible but also biologically compatible with the host's innate resistance mechanisms. This study aimed to assess the efficiency of spectinomycin as a selective marker in genome editing of *Shigella flexneri* 2a using CRISPR/Cas9 technology and to explore alternative antibiotic markers to overcome limitations arising from antibiotic resistance.

Materials and Methods

The *pic* gene target was identified using bioinformatics tools, and specific guide RNAs (gRNAs) were designed using CHOPCHOP to optimize GC content and secondary structure. The gRNA was cloned into the pTargetF plasmid using BbsI restriction enzyme digestion and ligation following oligonucleotide annealing. Colony PCR with specific primer sets and Sanger sequencing confirmed the correct insertion of the gRNA into pTargetF. The Cas9 expression plasmid pEcCas (conferring kanamycin resistance) was transformed into *Shigella flexneri* 2a via heat-shock. Competent cells were prepared using cold 0.1M CaCl₂ solution and stored in 10% glycerol at -80°C. The presence of pEcCas was validated using colony PCR. Electrocompetent cells harboring pEcCas were transformed with both the recombinant pTargetF:gRNA-*pic* plasmid and donor DNA containing homology-directed repair (HDR) arms. Electroporation was performed at 1800 V, and transformed cells were recovered in LB broth without antibiotics and

plated on LB agar containing spectinomycin (100 µg/mL) and kanamycin (50 µg/mL). To test alternative antibiotics, wild-type *Shigella flexneri* 2a was also plated on LB agar supplemented with ampicillin, chloramphenicol, and streptomycin at standard working concentrations.

Results

The presence of uniformly distributed bacterial growth across LB agar plates containing both spectinomycin and kanamycin demonstrated that *S. flexneri* 2a is intrinsically resistant to spectinomycin. This resistance made it impossible to distinguish recombinant colonies from non-transformed cells. In contrast, kanamycin selection proved successful. When plated on kanamycin-containing media, distinct and isolated colonies of *S. flexneri* 2a containing pEcCas were observed, indicating that the strain remains sensitive to kanamycin, making it a suitable selective marker in this context. Further investigation revealed that *S. flexneri* 2a also exhibited dense and uniform growth on LB agar plates containing ampicillin, chloramphenicol, and streptomycin, indicating broad intrinsic or acquired resistance. Control experiments using *Escherichia coli* O157:H7, a spectinomycin-sensitive strain, validated the effectiveness of spectinomycin as a selective agent in susceptible bacteria. Clear, isolated recombinant colonies were observed in *E. coli*, whereas the same medium failed to select clones in *Shigella flexneri* 2a.

Conclusions

Our study provides evidence that spectinomycin is not a suitable selective marker for CRISPR/Cas9-based genome editing in *Shigella flexneri* 2a due to its intrinsic or acquired resistance. This resistance impairs the identification and selection of recombinant clones, which is a critical step in genome editing workflows. The data highlight the necessity of conducting antibiotic susceptibility testing before implementing selection strategies in molecular cloning or gene editing projects. Without this pre-evaluation, there is a risk of selecting false-positive clones or misinterpreting transformation efficiency. Techniques such as minimum inhibitory concentration (MIC) assays or disk diffusion testing are recommended for preliminary screening. For future research involving resistant strains like *S. flexneri* 2a, we recommend adopting alternative antibiotic markers, such as kanamycin, which showed consistent selective efficiency in this study. Alternatively, markerless CRISPR/Cas9 systems could be employed to eliminate the reliance on antibiotic-based selection altogether. Markerless systems use counter-selection or site-specific recombination techniques to isolate edited clones without the need for antibiotic resistance genes. This study also underscores the broader concern of increasing antibiotic resistance in clinical strains of *Shigella flexneri*, especially serotype 2a. The dissemination of plasmids carrying resistance genes such as *aadA1*, often associated with resistance to both spectinomycin and streptomycin, could be a contributing factor. These plasmids encode

modifying enzymes like adenylyltransferases, which chemically inactivate spectinomycin. Mutations in 16S rRNA and ribosomal proteins may also contribute to resistance, further reducing the efficacy of traditional selection markers. Overall, this research emphasizes a critical aspect of genome engineering: that the host's antibiotic resistance profile must be factored into vector and marker selection to ensure experimental success. Moreover, tailoring the selection strategy to each strain's resistance landscape not only enhances experimental efficiency but also prevents misinterpretation of genome editing outcomes due to unintended background growth. Understanding these limitations and planning around them enables researchers to achieve more reliable and interpretable results in bacterial genome editing studies.

Author Contributions

Conceptualization: E. K. and H. S.; methodology, E. K., H. S. and M. M.; data curation, E. K.; writing—original draft preparation, E. K.; writing—review and editing, H. S. and M. M.; supervision, H. S. and M. M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

Data are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

Sincere appreciation is extended to the Vice Chancellor for Research of Shahid Bahonar University of Kerman, Iran and all individuals who provided valuable support and assistance during various stages of this research.

Ethical Considerations

This study involved no animal or human subjects. All laboratory procedures adhered to biosafety guidelines approved by the host institution.

Funding

This research was funded by the Vice Chancellor for Research of Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

اثر مقاومت ذاتی باکتری *Shigella flexneri 2a* به آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین بر

کارایی سیستم CRISPR/Cas9

الهه کاظمی پور

کارشناسی ارشد، بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. آدرس ایمیل:

Kazemipour.elaheh@gmail.com

 حسینعلی ساسان

*نویسنده مسئول: دانشیار بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. آدرس

ایمیل: hsasa@uk.ac.ir

 محمدرضا محمدآبادی

استاد بخش مهندسی علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. آدرس ایمیل:

mrm@uk.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۳۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۱۷

چکیده

هدف: ویرایش هدفمند ژن‌ها در باکتری‌های پاتوژن مانند *Shigella flexneri 2a* با استفاده از سیستم پیشرفته CRISPR/Cas9، گام مهمی در توسعه ابزارهای ژنتیکی و استراتژی‌های جدید درمانی است. با این حال، موفقیت این فرآیند به شدت به انتخاب صحیح باکتری‌های ترانسفورم‌شده وابسته است که معمولاً با استفاده از مارکرهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی انجام می‌گیرد. در مطالعه حاضر، کارایی مارکرهای آنتی‌بیوتیکی (اسپکتینومایسین و کلندامایسین) در وکتورهای پلاسمیدی pTargetF:grNA-pic و pEcCas در سویه بالینی *Shigella flexneri 2a* ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا، ناحیه هدف ژن *pic* (فاکتور بیماری‌زایی مهم در شیگلا) شناسایی شد. بر اساس این توالی، توالی راهنمای grNA، پرایمرهای اختصاصی و بازوهای همولوگ (HDR arms) با دقت طراحی شدند. سپس، کلونینگ sgRNA هدفمند به ژن *pic* در پلاسمید pTargetF انجام شد و صحت ساختار پلاسمید با روش‌های PCR و تعیین توالی تأیید گردید. در مرحله بعد، ورود پلاسمید pEcCas به درون سلول‌های *Shigella flexneri 2a* با روش شوک حرارتی با موفقیت انجام شد. سپس، پلاسمید pTargetF نو ترکیب به همراه بازوهای HDR، با استفاده از روش الکتروپوریشن به باکتری‌های حاوی

پلاسمید pEcCas منتقل شدند. انتخاب اولیه کلون‌های ترانسفورم شده در مرحله کلونینگ بر روی محیط کشت LB حاوی کانامایسین موفقیت‌آمیز بود. برای بررسی جایگزین‌های احتمالی آنتی‌بیوتیک، سویه وحشی *Shigella flexneri* 2a نیز بر روی محیط‌های حاوی کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شد.

نتایج: پس از الکتروپوریشن و کشت سویه‌های نو ترکیب و سویه وحشی (کنترل) در محیط حاوی اسپکتینومایسین و کانامایسین، رشد یکنواخت باکتریایی در کل سطح پلیت مشاهده شد، به گونه‌ای که امکان تفکیک کلون‌های ترانسفورم وجود نداشت. این عدم توانایی در تفکیک کلون‌های مقاوم، به وضوح نشان‌دهنده مقاومت ذاتی یا گسترده سویه *Shigella flexneri* 2a به اسپکتینومایسین است. همچنین، در کشت سویه وحشی بر روی محیط‌های حاوی کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین و استرپتومایسین نیز رشد بی تفاوت و گسترده باکتری مشاهده شد که مؤید مقاومت ذاتی این سویه به چندین آنتی‌بیوتیک رایج است.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها تاکید می‌کند که در این سویه خاص، استفاده از اسپکتینومایسین به عنوان مارکر انتخابی نامناسب است. برای ویرایش موفق ژن‌های پاتوژنیک در سویه‌های مقاوم مشابه، پیشنهاد می‌شود از نشانگرهای انتخابی جایگزین که باکتری به آن‌ها حساس است (مانند کانامایسین) یا از سیستم‌های بدون مارکر (markerless) استفاده شود. همچنین، انجام آزمون‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی مقدماتی (حتی به صورت ساده‌سازی شده) پیش از هر اقدام کلونینگ مولکولی یا ویرایش ژنوم ضروری است.

کلیدواژه‌ها: اسپکتینومایسین، دستکاری ژنتیکی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، CRISPR/Cas9، *Shigella flexneri* 2a.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: کاظمی پور الهه، ساسان حسینی، محمدآبادی محمدرضا (۱۴۰۴) اثر مقاومت ذاتی باکتری *Shigella flexneri* 2a به

آنتی بیوتیک اسپکتینومایسین بر کارایی سیستم CRISPR/Cas9. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۳)، ۱۷۷-۲۰۰.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian

Biotechnology Society.

© the authors



مقدمه

باکتری *Shigella* (متعلق به خانواده *Enterobacteriaceae*) در سال ۱۸۹۷ توسط Kiyoshi Shiga به عنوان عامل اسهال خونی باسیلی شناخته شد (Trofa et al., 1999; *Shigella species*, 2008). که باکتری گرم منفی، بی هوازی اختیاری، غیرمتحرک و غیر اسپور ساز می‌باشد (Schnupf & Sansonetti, 2019). عفونت معمولاً به لایه سطحی مخاط کولون محدود شده و با پاسخ التهابی میزبان همراه است که در نهایت منجر به تخریب لایه اپیتلیال کولون می‌شود (Bennish, 1991) و پاسخ التهابی متعاقب میزبان، لایه اپیتلیال کولون را از بین می‌برد (Philpott et al., 2000). تخریب لایه اپیتلیال منجر به علائم بالینی

اسهال آبکی، tenesmus و کرامپ شکمی می‌شود که در نهایت باعث ایجاد مدفوع مخاطی خونی می‌گردد (Bennish, 1991). عوارض بیشتر، بسته به گونه باکتری آلوده کننده و زیرگروه HLA^۱ میزبان، شامل سندرم همولیتیک اورمیک^۲ (HUS) و آرتریت واکنشی می‌باشد (Organization, 2005). سرگروه اصلی مرتبط با Shigellosis در کشورهای در حال توسعه، *Shigella flexneri* می‌باشد (Oany et al., 2017). از میان پاتوژن‌های روده‌ای مهم، باکتری *Shigella*، به‌ویژه سویه‌های *Shigella sonnei* و *Shigella flexneri*، به دلیل تکامل سریع و توانایی در توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی، چالش‌های قابل توجهی برای سلامت عمومی در سطح جهانی ایجاد می‌کنند. این چالش به‌ویژه در درمان شیگلوز با آنتی‌بیوتیک‌ها مشهود است، چراکه *Shigella flexneri* به طور فزاینده‌ای در حال مقاوم شدن در برابر آنتی‌بیوتیک‌هاست. این در حالی است که آنتی‌بیوتیک‌ها عموماً برای کاهش دوره دفع باکتری از میزبان استفاده می‌شوند (Ashkenazi et al., 2003; Chung et al., 2021). با توجه به مقاومت ذاتی سویه *Shigella flexneri 2a* به اسپکتینومایسین که می‌تواند مانع از انتخاب دقیق کلون‌های نو ترکیب در پروژه‌های ویرایش ژن مبتنی بر CRISPR/Cas9 شود، هدف این مطالعه بررسی این مقاومت و ارائه راهکارهای جایگزین برای انتخاب کلون‌های موفق است. ژن *pic* در *S. flexneri 2a* در جزیره بیماری‌زایی PAI^۳ بر روی کروموزوم اصلی قرار دارد (Al-Hasani et al., 2001). پروتئین *pic* یک پروتئین خود انتقال یابنده، 116KDa می‌باشد که با سرین پروتئازهای خودانتقال یابنده از غشا سلولی خانواده *Enterobacteriaceae* ترشح می‌شود (Henderson et al., 1999; Henderson & Nataro, 2001) و با فعالیت موسینولیتیک خود لایه مخاطی ضخیم روده بزرگ را تخریب کرده تا باکتری *Shigella* به اپیتلیوم دسترسی داشته باشد (Gutierrez-Jimenez et al., 2008). سیستم کریسپر اصلاح دقیق ژنوم در مهندسی ژنتیک مهم می‌باشد. توسعه پیش‌رونده فناوری، امکان استفاده از تکنیک‌هایی جهت تغییرات در ژنوم را فراهم کرده است. ضروری‌ترین ابزارها برای ویرایش ژنوم، آنزیم‌هایی از قبیل نوکلئازهای انگشت روی (ZFNs)^۴ و نوکلئازهای فعال کننده رونویسی (TALENs)^۵ می‌باشند (Richardson et al., 2016). ابزارهای ویرایش ژنوم با یک ویژگی مشترک تعیین شده می‌توانند برای شکستگی‌های دو رشته‌ای DNA (DSBs)^۶ در مکان مورد نظر طراحی شوند. یک DSB می‌تواند سیستم طبیعی ترمیم DNA سلولی را فعال کرده و برای بهبود کارایی ایجاد تغییرات در ژنوم استفاده شود (Haapaniemi et al., 2018). نوع جدیدی از فناوری مهندسی ژنوم مبتنی بر سیستم CRISPR (تکرارهای کوتاه پالیندرومیک پراکنده منظم خوشه‌ای)، که به عنوان یک سازوکار ایمنی تطبیقی در باکتری‌ها عمل می‌کند و با استفاده از RNA راهنما قادر به شناسایی عناصر خارجی مانند پلاسمید و ویروس است، و ابزاری قدرتمند در تنظیم دقیق بیان ژن‌ها مطرح شده و امکان ویرایش هدفمند ژنوم را با دقت بالا فراهم می‌کند (Hashemabadi et al., 2024; Jinek et al., 2013).

^۱ Human Leukocyte Antigen^۲ Haemolytic uraemic syndrome^۳ Pathogenicity Island 1^۴ Zinc-finger nucleases^۵ Transcription activator-like effector nucleases^۶ Double-strand break

Samare Gholami et al., 2020; 2012). در سیستم CRISPR نوع II با منشأ از *Streptococcus pyogenes* جفت شدن دو RNA شامل crRNA و tracrRNA، پلتفرمی را برای هدایت آنزیم اندونوکلاز Cas9 جهت برش اختصاصی DNA هدف فراهم می کند (Hashemabadi et al., 2023). این تکنیک نسبت به روش های قبلی ذکر شده برای ویرایش ژنوم، دارای مزایایی است، از جمله اینکه در این روش از یک توالی RNA کوتاه (sgRNA)^۷ برای شناسایی جایگاه هدف به جای طراحی نوکلئازهای اختصاصی استفاده می شود که این عامل مهم برای صرفه جویی در وقت و هزینه است (Kozovska et al., 2021). در بسیاری از سیستم های ویرایش ژنوم مبتنی بر CRISPR/Cas9، استفاده از مارکرهای آنتی بیوتیکی برای انتخاب کلون های موفق ترانسفورم شده امری رایج و ضروری است. این مارکرها با فراهم کردن مقاومت به آنتی بیوتیک خاص، امکان شناسایی و جداسازی باکتری های نو ترکیب را فراهم می کنند. انتخاب دقیق مارکر آنتی بیوتیکی نقش کلیدی در موفقیت پروژه های ویرایش ژن دارد، زیرا مارکرهای ناکارآمد یا مقاومتی که به صورت ذاتی در باکتری وجود دارد، می تواند منجر به انتخاب نادرست و کاهش کارایی روش شود (Jiang et al., 2013; Reisch & Prather, 2015). مارکر آنتی بیوتیکی اسپکتینومایسین در انتخاب کلون و ذکر گزارش های مقاومت ذاتی در باکتری *Shigella flexneri 2a* نقش مهمی دارد. اسپکتینومایسین به عنوان یک آنتی بیوتیک انتخابی نقش کلیدی در فرایندهای ویرایش ژن، به ویژه در مرحله شناسایی و انتخاب سلول های ترانسفورم شده ایفا می کند. در بسیاری از روش های مبتنی بر وارد کردن پلاسمید، این آنتی بیوتیک برای غربالگری سلول هایی که با موفقیت پلاسمید حامل ژن مقاومت به اسپکتینومایسین را دریافت کرده اند، به کار می رود. استفاده از محیط کشت حاوی اسپکتینومایسین باعث می شود تنها سلول های واجد پلاسمید رشد کنند، که این امر دقت و کارایی کل فرآیند ویرایش ژنومی را به میزان قابل توجهی افزایش می دهد (Reisch & Prather, 2015). باکتری *Shigella* به اسپکتینومایسین مقاومت ذاتی دارد. در سال های اخیر، افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه های مختلف *Shigella* به ویژه *Shigella flexneri* سروتپ ۲a، به یکی از چالش های مهم در حوزه سلامت عمومی تبدیل شده است. داده های حاصل از مطالعه ای در کلکته، هند، بین سال های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۹ نشان داد که *Shigella flexneri* با سهم ۷۶.۱ درصد، شایع ترین گونه در میان بیماران مبتلا به اسهال حاد بوده و سروتپ ۲a نیز با شیوع ۵۴ درصدی به عنوان غالب ترین زیرگروه شناخته شده است. این سروتپ ها سطوح بالایی از مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های رایج از جمله نالیدیکسیک اسید، سیپروفلوکساسین، افلوکساسین، نورفلوکساسین، تتراسایکلین، کوتریموکسازول و استرپتومایسین از خود نشان داده اند. علاوه بر این، میزان مقاومت به داروهایی مانند آمپی سیلین و سفترایاکسون نیز روند افزایشی داشته است، به طوری که در بازه مورد بررسی، مقاومت به آمپی سیلین از ۴۷.۹ درصد به ۶۹.۲ درصد و مقاومت به سفترایاکسون از ۳.۲ درصد به ۹.۶ درصد افزایش یافت (Bose et al., 2024). مکانیسم مقاومت به اسپکتینومایسین در *Shigella flexneri* عمدتاً با حضور پلاسمیدهای خاصی مانند pCN1 مرتبط است. این پلاسمید حامل ژنی است که آنزیم آدنیلیل ترانسفراز را کد می کند؛ آنزیمی که با افزودن گروه

⁷ Single Guide RNA

آدنیل به مولکول اسپکتینومایسین، موجب غیرفعال سازی آن می شود. در نتیجه، این تغییر شیمیایی منجر به بی اثر شدن آنتی بیوتیک و افزایش مقاومت باکتری می گردد. پلاسمید pCN1 به عنوان ناقل اصلی این ژن مقاومت، نقش کلیدی در انتقال و بروز مقاومت به اسپکتینومایسین در این گونه باکتریایی ایفا می کند. ژن *aadA1*، که بر روی پلاسمیدهایی مانند pCN1 حمل می شود، مسئول تولید این آنزیم غیرفعال کننده است و در نتیجه مقاومت به هر دو آنتی بیوتیک استرپتومایسین و اسپکتینومایسین را ایجاد می کند (Chinault et al., 1986). در پروژه های ویرایش ژنومی با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9، انتخاب کلون های موفق معمولاً با استفاده از مارکرهای آنتی بیوتیکی انجام می شود. در سویه های مقاوم به اسپکتینومایسین مانند *Shigella flexneri*، استفاده از این مارکر می تواند منجر به انتخاب نادرست و عدم شناسایی کلون های ترانسفورم شده شود. این موضوع می تواند کارایی و دقت پروژه های ویرایش ژنومی را تحت تأثیر قرار دهد. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر مقاومت ذاتی سویه *Shigella flexneri 2a* به اسپکتینومایسین بر کارایی انتخاب کلون های حاوی سیستم CRISPR/Cas9 برای ویرایش ژن *pic* و ارائه راهکارهایی برای استفاده از نشانگرهای دارویی جایگزین است.

مواد و روش ها

سویه های باکتریایی و پلاسمیدها. سویه های باکتریایی و پلاسمیدهای استفاده شده در تمام مراحل این مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

آنالیزهای بیوانفورماتیکی و پرایمرها: طراحی کارآمد gRNA، که گام نخست در ویرایش ژنومی با سیستم CRISPR/Cas9 است، با ارزیابی دقیق توالی هدف و استفاده از سایت CHOPCHOP انجام گرفت. این ابزار برای انتخاب gRNA های ۲۰ نوکلئوتیدی بر اساس درصد GC بهینه، توزیع یکنواخت و ساختار ثانویه به کار رفت. الحاق gRNA به پلاسمید pTargetF با استفاده از PCR و پرایمرهای اختصاصی ذکر شده در جدول ۲ انجام شد. توالی پرایمرهای مربوط به پلاسمید pEcCas، بازوهای همولوگ و قطعه DNA دهنده مربوط به ژن *pic*، که ستر آن ها توسط شرکت BioMagic انجام شده بود، به ترتیب در جدول ۳ و ۴ ارائه شده است.

ساخت پلاسمید pTargetF حاوی gRNA: برای کلونینگ توالی gRNA در پلاسمید pTargetF، ابتدا پلاسمید با آنزیم BbsI برش داده و خطی سازی گردید. توالی gRNA دو رشته ای با انیل کردن الیگونوکلئوتیدهای مکمل (W و K) در دستگاه PCR و با استفاده از یک برنامه حرارتی مرحله ای (در ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه دمای ۹۵°C) (با هدف باز شدن ساختارهای ثانویه) و سپس ۵ ثانیه دمای ۹۴°C تنظیم شد و بعد از آن برنامه دستگاه به گونه ای تنظیم گردید که با کاهش تدریجی دما طی ۶۹ سیکل (کاهش ۱°C به ازای هر سیکل طی ۱۰ ثانیه) دمای محتویات به ۲۵°C برسد و پرایمرها به یکدیگر متصل شوند،

ساخته شد. محصول انیلینگ، پس از رقیق سازی، در دمای 16°C و سپس $22-25^{\circ}\text{C}$ با پلاسمید خطی شده انکوبه شد تا واکنش لیگیشن انجام گیرد. پلاسمید نو ترکیب حاصل برای ترانسفورماسیون های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱. سویه های باکتریایی و پلاسمیدهای مورد استفاده در مراحل مختلف پژوهش

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in different stages of the study

شرکت سازنده Company	سویه باکتری / پلاسمید Bacterial strain/plasmid
مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران	<i>Shigella flexneri 2a</i>
گروه میکروبیولوژی دانشگاه شهیدباهنر	<i>Escherichia coli DH5a</i>
مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران	<i>Escherichia coli O157:H7</i>
Addgene*	PTargetF plasmid
Addgene	pEcCas9 plasmid

* شرکت Addgene، مستقر در واترتاون، ماساچوست، ایالات متحده آمریکا

جدول ۲. پرایمرهای اثبات کلونینگ gRNA

Table 2. Primers for gRNA cloning confirmation

نام پرایمر Primer Name	توالی پرایمر F (5'→3') F Primer Sequence (5'→3')	نام پرایمر Primer Name	توالی پرایمر R (5'→3') R Primer Sequence (5'→3')	اندازه محصول (bp) Product Size (bp)
F-pTarget-vector	AGCGAGTCAGTGAGCGAG	R-pTarget-vector	ACTCCACCGCTGATGACATC	400
R-pTarget-vector	ACTCCACCGCTGATGACATC	gRNA (W)	ACCAACAGATTATCTGAACC	270
F-pTarget-vector	AGCGAGTCAGTGAGCGAG	gRNA (K)	GGTTCAGATAATCTGTTGGT	150

جدول ۳. پرایمرهای پلاسمید pEcCas

Table 3. pEcCas Vector Primers

نام پرایمر Primer Name	توالی پرایمر F (5'→3') F Primer Sequence (5'→3')	نام پرایمر Primer Name	توالی پرایمر R (5'→3') R Primer Sequence (5'→3')	اندازه محصول (bp) Product Size (bp)
F-pEcCas	ATGGATAAGAAATACTC AATAG	R-pEcCas	TCTAAAATATACTTCAGT CACCTCC	4120

جدول ۴. پرایمرهای ساخت بازوهای همولوگ و Donar DNA

Table 4. Primers for Homologous Arms and Donor DNA Construction

نام پرایمر Primer Name	توالی (5'→3') Sequence (5'→3')	اندازه محصول (bp) Product Size (bp)
A1	GGTGCTACGAACTGGTGGAAATGTCATACCAACAGATT ATCTGAGTCGACCAC	52
A2	CGTCCTGCATAACCTGGTAAGCGGTGTAACGTTTCAGT GGTCGACTCAG	48
A3	CCGGAACAAAGTCTACGGGGGCATCGAAATCGTCCT GCATAACCTGG	48
Primer(F)-amp	TATTAATGGTGCTACGAACTGG	22
Primer(R)-amp	CCCAGTCCGGAAACAAAG	18

آماده سازی و ترانسفورماسیون سلول های مستعد DH5α: سویه *E. coli* DH5α برای آماده سازی سلول مستعد، در محیط LB Broth بدون آنتی بیوتیک رشد داده شد و در فاز لگاریتمی برداشت گردید. سلول ها با محلول سرد 0.1 M CaCl₂ تیمار شدند و سپس محلول حاوی CaCl₂ و گلیسرول به آن ها اضافه و در دمای 80°C ذخیره شدند. برای ترانسفورماسیون، ابتدا سلول ها با β-مرکاپتواتانول تیمار شده، سپس DNA لیگ شده اضافه و پس از انکوباسیون روی یخ، شوک حرارتی در دمای 42°C به مدت 48 ثانیه اعمال شد. سلول ها پس از بازیابی در محیط LB، بر روی پلیت های حاوی اسپکتینومایسین (با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) کشت داده شدند. صحت کلونینگ با کلنی PCR (با استفاده از سه جفت پرایمر FR، WR و FK) و تعیین توالی، پس از انجام واکنش PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر که شامل ۵ میکرولیتر مسترمیکس آمپلیکون، ۰.۵ میکرولیتر از پرایمرهای ذکر شده (با غلظت ۱۰۰ میکرومولار)، ۰.۵ میکرولیتر DNA الگو و ۳.۵ میکرولیتر آب مقطر بود، تأیید شد؛ برنامه PCR شامل دناتوراسیون اولیه ۵ دقیقه ای در ۹۵°C و سپس ۳۵ سیکل متوالی با مراحل ۲۰ ثانیه در ۹۵°C، ۳۵ ثانیه در ۵۷°C و ۳۵ ثانیه در ۷۲°C در دستگاه ترموسایکلر بود، که نتایج آن با الکتروفورز ژل بررسی گردید.

انتقال و تأیید پلاسمید pEcCas در *Shigella flexneri* 2a: به منظور انتقال آنزیم Cas9 به *Shigella flexneri* 2a از پلاسمید pEcCas (۱۴۶۰۵ جفت باز، حاوی ژن مقاومت به کانامایسین) استفاده شد. پیش از انتقال، سلول های *Shigella flexneri* 2a برای ترانسفورماسیون مستعدسازی شدند. یک کلنی از باکتری در محیط LB Broth کشت داده و پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون در 37°C و 180 rpm مقداری از کشت به محیط تازه منتقل و مجدداً برای ۲ ساعت رشد داده شد. همزمان، محلول 0.1 M کلسیم کلراید تهیه و خنک سازی شد. پس از سانتریفیوژ کشت باکتری، رسوب سلولی در محلول CaCl₂ بازسوسپانسیون شد. سپس، پس از دو مرحله شستشو و افزودن مخلوط CaCl₂ و گلیسرول، سوسپانسیون حاصل در

میکروتیوب‌های ۱.۵ میلی‌لیتری تقسیم و در دمای 80°C - نگهداری شد. برای انجام شوک حرارتی، 100 میکرولیتر از سلول‌های مستعد روی یخ قرار داده شد تا ذوب شود. سپس 1.6 میکرولیتر بتامرکاپتوتانول (1.5 M) و 4 میکرولیتر از پلاسمید pEcCas به آن اضافه گردید. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت، سپس به مدت 48 ثانیه در دمای 42°C شوک داده شد و مجدداً روی یخ گذاشته شد. پس از افزودن 1 میلی‌لیتر محیط کشت بدون آنتی‌بیوتیک، انکوباسیون به مدت 1.5 ساعت در دمای 37°C انجام شد. نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و رسوب در مقدار کمی سوپرناتانت حل و روی پلیت حاوی کانامایسین (با غلظت اولیه ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد. برای تأیید انتقال موفق پلاسمید، از کلنی‌های رشدیافته، کلنی PCR با پرایمر اختصاصی انجام شد و پس از تأیید وجود پلاسمید، از این سویه‌ها به عنوان منبع باکتری حامل پلاسمید در مراحل بعدی استفاده گردید.

هم‌انتقالی pTargetF-gRNA و DNA دهنده به *Shigella flexneri* 2a (حاوی pEcCas) و انتخاب با

آنتی‌بیوتیک: الگوی DNA دهنده با PCR و با استفاده از الیگونوکلئوتیدهای F-amp، R-amp، A1، A2، A3 تکثیر شد. برای تهیه سلول‌های مستعد الکتروپوریشن از سویه *Shigella flexneri* 2a حاوی پلاسمید pEcCas، این باکتری در محیط مایع LB حاوی کانامایسین (با غلظت اولیه ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد. سپس برای القای بیان سیستم λ -Red، کشت باکتری به محیط تازه حاوی کانامایسین و $250\ \mu\text{L}$ ماده القایی L-arabinose منتقل و در دمای 30°C به مدت ۳.۵ ساعت انکوبه شد. پس از آن، سلول‌ها به‌منظور آماده‌سازی برای شوک الکتریکی، در چند مرحله با محلول‌های سرد حاوی ۱۰٪ گلیسرول شسته شده و در نهایت در حجم نهایی 2 mL گلیسرول ۱۰٪ بازسوسپانسیون شدند. سوسپانسیون نهایی به حجم‌های 50 میکرولیتر در میکروتیوب‌ها تقسیم و در دمای 80°C - ذخیره شد. برای ترانسفورماسیون، سلول‌های مستعد از فریزر خارج شده و روی یخ ذوب شدند. سپس 5 μL پلاسمید نوترکیب pTargetF (3 μg) و DNA 4 μL دهنده (3.5 μg) به هر نمونه اضافه شد. پس از نگهداری نمونه‌ها در یخ، الکتروپوریشن در ولتاژ ۱۸۰۰ ولت انجام گرفت. بلافاصله پس از شوک، محیط کشت LB استریل به نمونه اضافه و سلول‌ها به مدت 2-3 ساعت در 30°C و 180 rpm انکوبه شدند.

انتخاب کلنی‌های نوترکیب در محیط کشت حاوی اسپکتینومایسین و کانامایسین: در مرحله نهایی انتخاب

کلنی‌های نوترکیب، پس از کشت سلول‌های ترانسفورم‌شده بر روی محیط کشت LB آگار حاوی اسپکتینومایسین (با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کانامایسین (با غلظت اولیه ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و پس از انکوباسیون به مدت 16 ساعت در دمای 37°C ، سطح کامل محیط کشت با رشد یکنواخت باکتریایی پوشیده شد. این رشد گسترده، امکان تشخیص و جداسازی کلنی‌های منفرد را از بین برد. این نتیجه نشان‌دهنده مقاومت ذاتی یا فراگیر در جمعیت باکتریایی *Shigella flexneri* 2a مورد استفاده بود و مانع از انتخاب دقیق کلنی‌های حامل پلاسمید نوترکیب شد. در مقابل و به عنوان یک کنترل مثبت برای عملکرد اسپکتینومایسین، وقتی سویه *Escherichia Coli* O157:H7 (که به اسپکتینومایسین حساس است) تحت شرایط مشابهی کشت داده شد، کلنی‌های نوترکیب منفرد به وضوح بر روی پلیت‌ها رشد کردند. این امر تأییدکننده کارایی اسپکتینومایسین به عنوان یک عامل

انتخابی مؤثر در سویه‌های حساس بود و به وضوح تفاوت مقاومت ذاتی *Shigella flexneri* 2a را در برابر این آنتی‌بیوتیک برجسته ساخت.

ارزیابی آنتی‌بیوتیک‌های جایگزین در سویه وحشی *Shigella flexneri* 2a به منظور بررسی امکان استفاده از

آنتی‌بیوتیک‌های جایگزین، سه آنتی‌بیوتیک رایج شامل استرپتومایسین (با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، آمپی‌سیلین (با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) و کلرامفنیکل (با غلظت اولیه ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به طور جداگانه در محیط کشت LB آگار مورد استفاده قرار گرفتند. سویه وحشی *Shigella flexneri* 2a روی هر یک از این محیط‌ها کشت داده شد و پس از انکوباسیون در دمای 37°C، رشد کامل و گسترده باکتری در تمام پلیت‌ها مشاهده گردید.

نتایج

کلونینگ موفقیت‌آمیز gRNA در پلاسمید pTargetF: انتقال پلاسمید نوترکیب pTargetF به سلول‌های مستعد

E. coli DH5α از طریق شوک حرارتی، منجر به تشکیل کلنی‌های سفید رنگ روی محیط کشت جامد حاوی اسپکتینومایسین (با غلظت اولیه ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) شد. تحلیل این کلنی‌ها با استفاده از کلنی PCR و سه جفت پرایمر (RC/W، FC/RC، FC/K) باندهایی با اندازه‌های 400، ۲۷۰ و 150 جفت باز را نشان داد. تشکیل باندهای پلکانی در الکتروفورز، مؤید کلونینگ موفقیت‌آمیز قطعه gRNA در پلاسمید pTargetF بود. در نهایت، توالی‌یابی این پلاسمید، صحت کلونینگ gRNA را تأیید کرد (شکل‌های ۱ و ۲).



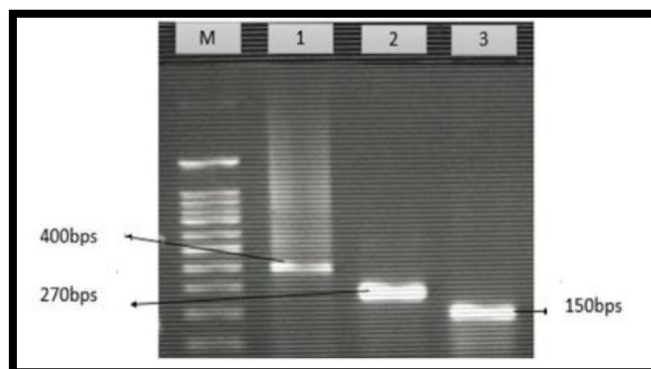
شکل ۱. کلنی‌های نوترکیب ایجادشده بر روی محیط کشت جامد حاوی آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین

Figure 1. Recombinant colonies formed on solid culture medium containing spectinomycin

انتقال موفقیت‌آمیز پلاسمید pEcCas به *Shigella flexneri* 2a پس از انجام شوک حرارتی و انتقال پلاسمید

pEcCas به سلول‌های مستعد *Shigella flexneri* 2a و کشت آن‌ها روی محیط حاوی کانامایسین (با غلظت اولیه ۱۰۰

میلی گرم بر میلی لیتر)، کلنی های سفید رنگ مشاهده شدند. بررسی این کلنی ها با استفاده از کلنی PCR و پرایمرهای اختصاصی F-pEcCas و R-pEcCas، باند DNA با طول ۴۱۲۰ جفت باز را نشان داد که حضور پلاسمید pEcCas را در سلول های باکتریایی ترانسفورم شده تأیید می کرد (شکل های ۳ و ۴).



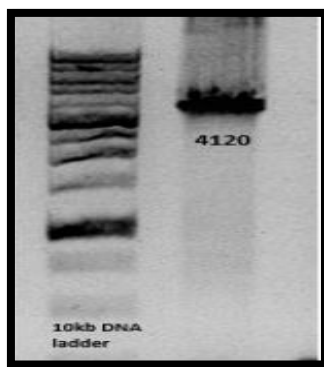
شکل ۲. بررسی الکتروفورزی کلنی PCR به منظور تایید کلونینگ. از چپ به راست: مارکر مولکولی ۱۰۰ جفت بازی، باند ۴۰۰ جفت بازی حاصل تکثیر با پرایمرهای FC و RC پلاسمید، باند ۲۷۰ جفت بازی حاصل تکثیر پرایمرهای RC پلاسمید و رشته واتسون gRNA و باند ۱۵۰ جفت بازی حاصل تکثیر پرایمرهای FC پلاسمید و رشته کریک gRNA

Figure 2. Electrophoretic analysis of colony PCR for cloning confirmation. From left to right: 100 bp molecular ladder, 400 bp band from amplification with vector's FC and RC primers, 270 bp band from amplification with vector's RC primer and gRNA Watson strand, and 150 bp band from amplification with vector's FC primer and gRNA Crick strand



شکل ۳. کلنی های ایجاد شده حاصل شوک حرارتی و انتقال پلاسمید pEcCas به درون سلول های مستعد *Shigella flexneri 2a* بر روی محیط کشت جامد حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین

Figure 3. Colonies formed after heat shock and transfer of the pEcCas vector into competent *Shigella flexneri 2a* cells on solid culture medium containing kanamycin



شکل ۴. آنالیز الکتروفورزی کلنی PCR جهت تایید ورود پلاسمید pEcCas به سلول‌های مستعد طی پدیده شوک حرارتی

Figure 4. Electrophoretic analysis of colony PCR to confirm pEcCas plasmid entry into competent cells via heat shock

مقاومت ذاتی *Shigella flexneri* 2a به اسپکتینومایسین و پیامدهای آن برای انتخاب در سیستم CRISPR-Cas9: انتقال همزمان پلاسمید pTargetF (حامل gRNA اختصاصی) و قطعه DNA دهنده به سلول‌های مستعد *Shigella flexneri* 2a حاوی پلاسمید pEcCas با استفاده از الکتروپوریشن انجام شد. نکته قابل توجه در نتایج کشت باکتری‌های ترانسفورم شده بر روی محیط جامد حاوی هر دو آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین (با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) و کانامایسین (با غلظت اولیه ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، عدم مهار رشد در سطح پلیت بود. این رشد گسترده در حضور اسپکتینومایسین، حاکی از مقاومت ذاتی یا فراگیر سویه *Shigella flexneri* 2a به این آنتی‌بیوتیک است. این مقاومت از پیش موجود، در مراحل بعدی ویرایش ژنوم با سیستم CRISPR/Cas9، به ویژه در فرآیند انتخاب کلنی‌های حاوی پلاسمید pTargetF (که حامل ژن مقاومت به اسپکتینومایسین است)، اختلال ایجاد کرده و تفسیر نتایج را با مشکل مواجه ساخت (شکل ۵).

مقایسه الگوی رشد باکتری پس از الکتروپوریشن در *Shigella flexneri* 2a و *Escherichia*

***Coli* O157:H7 بر روی محیط انتخابی حاوی اسپکتینومایسین:** شکل ۶ کلنی‌های مجزا از باکتری *Escherichia coli* O157:H7 را نشان می‌دهد که مؤید موفقیت آمیز بودن ورود پلاسمید و انتخاب صحیح با استفاده از آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین در این سویه است. در مقابل، شکل ۵ که مربوط به *Shigella flexneri* 2a است، سطح کامل پلیت توسط رشد باکتریایی پوشیده شده و امکان تفکیک کلنی وجود ندارد. این تفاوت بارز، نشان‌دهنده مقاومت ذاتی یا گسترده به اسپکتینومایسین در *Shigella flexneri* 2a و ناکارآمدی این آنتی‌بیوتیک به عنوان عامل انتخابی در این سویه خاص است.



شکل ۵. عدم مشاهده کلنی‌های جهش یافته ایجاد شده بر روی محیط کشت جامد حاوی آنتی‌بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و کانامایسین به دلیل مقاومت ذاتی باکتری *Shigella flexneri 2a* نسبت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین

Figure 5. Absence of mutant colonies on solid culture medium containing spectinomycin and kanamycin due to the intrinsic resistance of *Shigella flexneri 2a* to spectinomycin



شکل ۶. کلنی‌های جهش یافته ایجاد شده بر روی محیط کشت جامد حاوی آنتی‌بیوتیک‌های اسپکتینومایسین و کانامایسین در باکتری *Escherichia coli* O157:H7 به عنوان کنترل

Figure 6. Mutant colonies formed on solid culture medium containing spectinomycin and kanamycin in *Escherichia coli* O157:H7 as a control

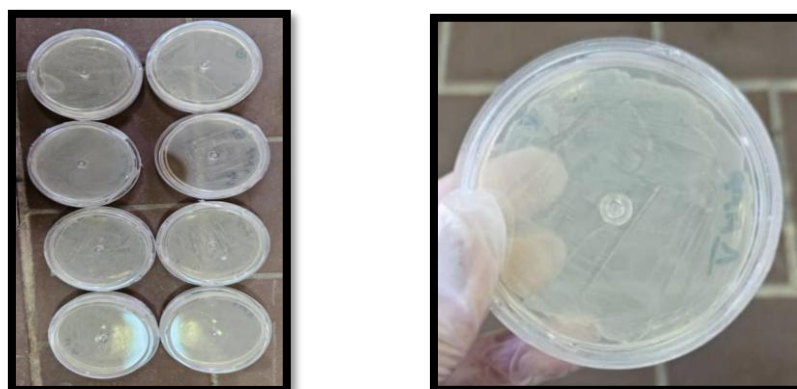
بررسی رشد *Shigella flexneri 2a* بر روی محیط‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌های جایگزین: جهت ارزیابی امکان استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های جایگزین به عنوان نشانگر انتخابی، سویه وحشی *Shigella flexneri 2a* بر روی محیط‌های کشت حاوی استرپتومایسین (با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، آمپی سیلین (با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) و کلرامفنیکل (با غلظت اولیه ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) کشت داده شد. در تمامی موارد، پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، رشد گسترده باکتریایی به صورت پوشش کامل سطح پلیت مشاهده گردید. این نتایج بیانگر مقاومت ذاتی یا اکتسابی سویه مورد

مطالعه به هر سه آنتی‌بیوتیک مذکور بوده و نشان می‌دهد که استفاده از آن‌ها نیز در انتخاب کلنی نوترکیب در این سویه مؤثر نخواهد بود (شکل ۷، ۸ و ۹).



شکل ۷. رشد سویه وحشی باکتری *Shigella flexneri* 2a بر روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل

Figure 7. Growth of wild-type *Shigella flexneri* 2a on chloramphenicol-containing medium



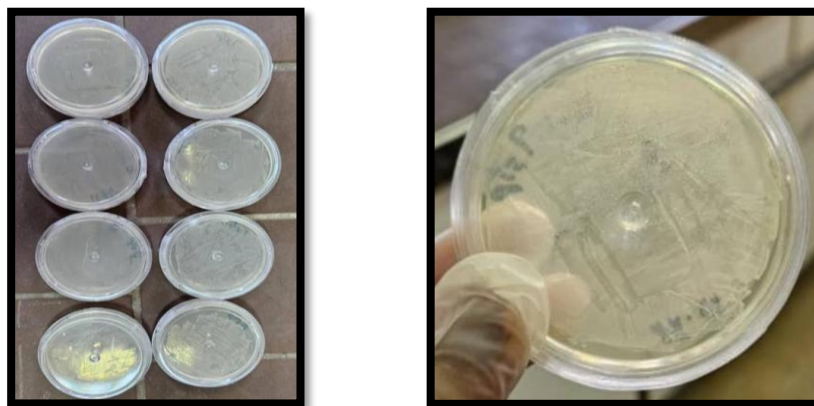
شکل ۸. رشد سویه وحشی باکتری *Shigella flexneri* 2a جدا شده از منابع مختلف بر روی محیط‌های حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین

Figure 8. Growth of wild-type *Shigella flexneri* 2a isolated from various sources on ampicillin-containing media

بحث

یکی از چالش‌های اساسی در طراحی این پژوهش، بررسی مقاومت ذاتی *Shigella flexneri* 2a نسبت به آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین بود. این مسئله از آن جهت اهمیت دارد که ژن مقاومت به اسپکتینومایسین به عنوان مارکر انتخابی در وکتور نوترکیب pTargetF:grNA-pic در سیستم CRISPR/Cas9 استفاده شده بود. مطالعه حاضر به وضوح نشان داد که سویه *Shigella flexneri* 2a مورد استفاده، رشد کامل در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین دارد. این یافته با رشد کامل و

یکنواخت باکتری در حضور غلظت بالای اسپکتینومایسین (با غلظت اولیه ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) در محیط کشت انتخابی تأیید شد. این مقاومت ذاتی، چالش مهمی را در انتخاب کلون‌های نوترکیب حاوی پلاسمید pTargetF:gRNA-pic (که حامل ژن مقاومت به اسپکتینومایسین است) در سیستم CRISPR/Cas9 *Shigella flexneri* 2a ایجاد کرد.



شکل ۹. رشد سویه وحشی باکتری *Shigella flexneri* 2a بر روی محیط حاوی آنتی بیوتیک استرپتومایسین

Figure 9. Growth of wild-type *Shigella flexneri* 2a on streptomycin-containing medium

همانطور که نتایج ما در مقایسه با رشد کلنی‌های مجزای *Escherichia coli* O157:H7 (که به اسپکتینومایسین حساس است و به عنوان کنترل استفاده شد) نشان داد، عدم تفکیک کلون‌های نوترکیب در *Shigella flexneri* 2a، عملاً کارایی مارکر انتخابی اسپکتینومایسین را از بین می‌برد (شکل‌های ۶ و ۷). این یافته با گزارش‌های پیشین در خصوص افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه‌های *Shigella* به ویژه سروتیپ 2a، همخوانی دارد. مطالعات گذشته نشان داده‌اند که *Shigella flexneri* 2a می‌تواند مقاومت چنددارویی گسترده‌ای نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج داشته باشد (Bose et al., 2024). این مسئله نشان می‌دهد که مقاومت مشاهده شده در مطالعه ما یک پدیده منحصر به فرد نیست، بلکه بازتابی از روند جهانی گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی در این پاتوژن است. مقاومت ذاتی *Shigella flexneri* 2a به اسپکتینومایسین و سایر آنتی بیوتیک‌ها، می‌تواند ناشی از مکانیسم‌های ژنتیکی مختلفی باشد:

الف) مقاومت با واسطه پلاسمیدها و آنزیم‌ها: یکی از مهم‌ترین دلایل، حضور ژن‌های مقاومت بر روی پلاسمیدها است. همانطور که در مقدمه اشاره شد، پلاسمیدهایی نظیر pCN1 که حامل ژن *aadA1* هستند، می‌توانند آنزیم آدنیلیل ترانسفراز را کد کنند. این آنزیم با افزودن گروه آدنیل به اسپکتینومایسین، آن را غیرفعال کرده و منجر به مقاومت به اسپکتینومایسین و استرپتومایسین می‌شود (Bose et al., 2024). حضور این پلاسمیدها و ژن‌های مقاومت مرتبط، می‌تواند توجیه‌کننده رشد کامل سویه *Shigella flexneri* 2a در حضور اسپکتینومایسین و استرپتومایسین باشد (به بخش نتایج مربوط به بررسی آنتی بیوتیک‌های جایگزین مراجعه شود). همچنین، پلاسمیدها نقش محوری در انتشار گسترده ژن‌های مقاومت به اسپکتینومایسین ایفا می‌کنند.

مطالعات نشان داده‌اند که پلاسمیدهای رایجی نظیر IncF، IncI و IncHI2 به طور معمول با انتشار ژن‌های مقاومت، از جمله آن‌هایی که آنزیم‌های اصلاح‌کننده آمینوگلیکوزید (AMEs) و متیل ترانسفرازها را کد می‌کنند، مرتبط هستند (Algarni et al., 2018; Rozwandowicz et al., 2024). این پلاسمیدها اغلب چندین ژن مقاومت را به طور همزمان حمل می‌کنند که به باکتری‌ها اجازه می‌دهد مقاومت چندارویی به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها پیدا کنند. تحرک بالای این پلاسمیدها تضمین می‌کند که ژن‌های مقاومت می‌توانند به سرعت در داخل و بین جمعیت‌های باکتریایی گسترش یابند؛ این موضوع می‌تواند توضیح‌دهنده شیوع مقاومت به اسپکتینومایسین در سویه *Shigella flexneri* 2a مورد مطالعه‌ی ما باشد.

(ب) جهش در پروتئین‌های ریبوزومی و 16S rRNA: در ادامه بررسی مکانیسم‌های مقاومت ذاتی، باید به نقش حیاتی جهش‌ها در 16S rRNA اشاره کرد. این مولکول، که جزء اصلی ریبوزوم باکتریایی است، هدف اصلی اسپکتینومایسین محسوب می‌شود. مطالعات پیشین، شناسایی جهش‌های تک‌بازی خاصی مانند C1066U و C1192U را در 16S rRNA گزارش کرده‌اند که منجر به مقاومت سطح بالا به اسپکتینومایسین می‌شوند. این جهش‌ها با تغییر جایگاه اتصال آنتی‌بیوتیک در ریبوزوم، توانایی اسپکتینومایسین را در مهار سنتز پروتئین به شدت کاهش می‌دهند. نکته قابل توجه این است که این جهش‌ها لزوماً کروموزومی نیستند و می‌توانند بر روی پلاسمیدها نیز حمل شوند، که این خود به انتشار سریع و گسترده آن‌ها در میان جمعیت‌های باکتریایی، از جمله در *Shigella flexneri* 2a، کمک می‌کند (O'connor & Dahlberg, 2002). همچنین، جهش در ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ریبوزومی نیز از مکانیسم‌های کروموزومی مهم هستند. به عنوان مثال، جهش در ژن *rpsE* که پروتئین ریبوزومی 5S را کد می‌کند، در سایر باکتری‌ها مانند (*Streptomyces roseosporus*) به وضوح با مقاومت به اسپکتینومایسین مرتبط شناخته شده است (He et al., 2005). این جهش‌ها عمدتاً با تغییر ساختار ریبوزوم و تأثیر بر عملکرد آن، مانع اتصال مؤثر آنتی‌بیوتیک شده و اثربخشی آن را کاهش می‌دهند. اگرچه در مطالعه حاضر مکانیسم دقیق مقاومت کروموزومی در سویه *Shigella flexneri* 2a به طور مستقیم بررسی نشد، اما با توجه به مقاومت ذاتی مشاهده‌شده، احتمال وجود چنین جهش‌هایی در این سویه نیز قوی است و می‌تواند به عنوان یک دلیل تکمیلی در کنار مکانیسم‌های پلاسمیدی مطرح گردد. بر اساس داده‌ها مشخص شد، مقاومت ذاتی سویه *Shigella flexneri* 2a به اسپکتینومایسین، فرآیند حیاتی انتخاب کلون‌های نو ترکیب را به طور جدی مختل کرد. این مسئله بر اهمیت حیاتی انجام آزمون‌های حساسیت آنتی‌بیوتیکی مقدماتی پیش از هرگونه اقدام کلونینگ مولکولی یا ویرایش ژنوم تأکید می‌کند. بنابراین، شناسایی دقیق حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به عنوان مارکر، برای جلوگیری از نتایج منفی کاذب در فرآیند انتخاب و تضمین موفقیت ویرایش ژنومی ضروری است. روش‌های استاندارد مانند تعیین حداقل غلظت مهار (MIC) و تست دیسک دیفیوژن ابزارهای کارآمدی برای ارزیابی حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف هستند (Henry & Russell, 1969; Smail, 2000). این آزمون‌ها نه تنها به پیش‌بینی پاسخ باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها کمک می‌کنند، بلکه مسیر انتخاب مارکرهای آنتی‌بیوتیکی مناسب و مؤثر را برای پروژه‌های ویرایش ژنوم با سیستم CRISPR/Cas9 در پاتوژن‌های مقاوم هدایت می‌کنند.

محدودیت‌های مطالعه و جهت‌گیری‌های آینده: یکی از محدودیت‌های اصلی این مطالعه، تمرکز بر روی یک سروتپ خاص (*Shigella flexneri* 2a) بود. برای درک جامع‌تر الگوی مقاومت و انتخاب مارکرهای مناسب، بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در سایر سروتپ‌های *Shigella* و حتی گونه‌های نزدیک مانند *E. coli* (به خصوص سویه‌های پاتوژنیک که ممکن است پلاسمیدهای مقاومت مشابهی داشته باشند) توصیه می‌شود. همچنین، این مطالعه مکانیسم دقیق مقاومت ذاتی را به صورت ژنتیکی بررسی نکرد. انجام توالی‌یابی کامل ژنوم یا تست‌های اختصاصی برای شناسایی ژن‌های مقاومت پلاسمیدی مانند (*aadA1*) و جهش‌های کروموزومی مرتبط با مقاومت به اسپکتینومایسین، می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص منشأ مقاومت در این سویه ارائه دهد. در راستای تحقیقات آتی، بررسی پتانسیل حذف ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی موجود در سویه *Shigella flexneri* 2a (چه کروموزومی و چه پلاسمیدی) با استفاده از سیستم‌های ویرایش ژنوم پیش از اعمال ویرایش هدفمند، می‌تواند رویکردی مؤثر باشد. این استراتژی نه تنها به غلبه بر چالش‌های انتخاب کلون کمک می‌کند، بلکه می‌تواند به توسعه سویه‌های *Shigella* حساس به آنتی‌بیوتیک‌های رایج برای مطالعات آزمایشگاهی یا حتی درمان‌های آینده منجر شود. علاوه بر این، ارزیابی دقیق‌تر کارایی سیستم‌های CRISPR/Cas9 در ویرایش ژن‌های پاتوژنیسته (مانند ژن *pic*) در سویه‌های مقاوم، نیازمند بهینه‌سازی دقیق‌تر پروتکل‌های ترانسفورماسیون و انتخاب است، به ویژه در شرایطی که مقاومت آنتی‌بیوتیکی مانعی جدی محسوب می‌شود.

نتیجه‌گیری: در مجموع، نتایج این پژوهش بر ضرورت انجام آزمون‌های حساسیت‌سنجی آنتی‌بیوتیکی مقدماتی پیش از آغاز هر پروژه ویرایش ژنوم با سیستم CRISPR/Cas9 در باکتری‌ها، به‌ویژه در پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مانند *Shigella flexneri* 2a، تأکید دارد. این آزمون‌ها تضمین می‌کنند که مارکر انتخابی به‌درستی عمل کرده و کلون‌های نوترکیب قابل شناسایی باشند. برای مطالعات آینده، پیشنهاد می‌شود در مواجهه با سویه‌های مقاوم، از مارکرهای جایگزین مانند کانامایسین (در صورت حساسیت سویه)، یا از سامانه‌های markerless بدون نیاز به انتخاب آنتی‌بیوتیکی استفاده شود. این راهکارها علاوه بر ارتقاء دقت و موفقیت در ویرایش ژنومی، می‌توانند به شناخت دقیق‌تر سازوکارهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پاتوژن‌های مهم کمک کنند.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان به دلیل همکاری و حمایت از انجام این پژوهش صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

ثمره غلامی، آزاده، ساسان، حسینعلی، هاشم آبادی، محمد، و روان، هادی. (۱۳۹۸). طراحی و ساخت ناقل نوترکیب CRISPR حاوی ژن LRRK2 بیماری پارکینسون. سلول و بافت، ۱۰(۴)، ۲۱۴-۲۲۵. <https://sid.ir/paper/364460/fa>

References

- Al-Hasani, K., Rajakumar, K., Bulach, D., Robins-Browne, R., Adler, B., & Sakellaris, H. (2001). Genetic organization of the she pathogenicity island in *Shigella flexneri* 2a. *Microbial Pathogenesis*, 30(1), 1-8. <https://doi.org/10.1006/mpat.2000.0404>.
- Algarni, S., Gudeta, D. D., Han, J., Nayak, R., & Foley, S. L. (2024). Genotypic analyses of IncHI2 plasmids from enteric bacteria. *Scientific Reports*, 14(1), 9802. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59870-2>.
- Ashkenazi, S., Levy, I., Kazaronovski, V., & Samra, Z. (2003). Growing antimicrobial resistance of *Shigella* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(2), 427-429. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg080>.
- Bennish, M. L. (1991). Potentially lethal complications of shigellosis. *Reviews of Infectious Diseases*, 13(Supplement_4), S319-S324. https://doi.org/10.1093/clinids/13.supplement_4.s319.
- Bose, P., Chowdhury, G., Halder, G., Ghosh, D., Deb, A. K., Kitahara, K., Miyoshi, S.-i., Morita, M., Ramamurthy, T., & Dutta, S. (2024). Prevalence and changing antimicrobial resistance profiles of *Shigella* spp. isolated from diarrheal patients in Kolkata during 2011–2019. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 18(2), e0011964. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011964>.
- Chinault, A. C., Blakesley, V. A., Roessler, E., Willis, D. G., Smith, C. A., Cook, R. G., & Fenwick Jr, R. G. (1986). Characterization of transferable plasmids from *Shigella flexneri* 2a that confer resistance to trimethoprim, streptomycin, and sulfonamides. *Plasmid*, 15(2), 119-131. [https://doi.org/10.1016/0147-619x\(86\)90048-x](https://doi.org/10.1016/0147-619x(86)90048-x).
- Chung The, H., Bodhidatta, L., Pham, D. T., Mason, C. J., Ha Thanh, T., Voong Vinh, P., Turner, P., Hem, S., Dance, D. A., & Newton, P. N. (2021). Evolutionary histories and antimicrobial resistance in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* in Southeast Asia. *Communications Biology*, 4(1), 353. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01905-9>.
- Gutierrez-Jimenez, J., Arciniega, I., & Navarro-García, F. (2008). The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate. *Microbial Pathogenesis*, 45(2), 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.04.006>.
- Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B., & Taipale, J. (2018). CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature Medicine*, 24(7), 927-930. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0049-z>.
- Hashemabadi, M., Sasan, H., Amandadi, M., Esmailzadeh-Salestani, K., Esmaili-Mahani, S., & Ravan, H. (2023). CRISPR/Cas9-mediated disruption of ZNF543 gene: an approach

- toward discovering its relation to TRIM28 gene in Parkinson's disease. *Molecular Biotechnology*, 65, ۲۵۱-۲۴۳, (۲). <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00494-0>.
- Hashemabadi, M., Sasan, H. A., Hosseinkhani, S., Amandadi, M., Samareh Gholami, A., & Sadeghizadeh, M. (2024). Intelligent guide RNA: dual toehold switches for modulating luciferase in the presence of trigger RNA. *Communications Biology*, 7(1), 1. ۳۴۴. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06988-8>.
- He, X., Miao, V., & Baltz, R. H. (2005). Spectinomycin resistance in rpsE mutants is recessive in *Streptomyces roseosporus*. *The Journal Of Antibiotics*, 58(4), 284-288. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.35>.
- Henderson, I. R., Czczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., & Nataro, J. P. (۱۹۹۹). Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 67(11), 5587-5596. <https://doi.org/10.1128/iai.67.11.5587-5596.1999>.
- Henderson, I. R., & Nataro, J. P. (2001). Virulence functions of autotransporter proteins. *Infection and Immunity*, 69(3), 1231-1243. <https://doi.org/10.1128/iai.69.3.1231-1243.2001>.
- Henry, J. B., & Russell, J. P. (1969). Antibiotic sensitivity testing. *Postgraduate Medicine*, 45(1), 51-54. <https://doi.org/10.1080/00325481.1969.11696981>.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 31(3), 233-239. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- Kozovska, Z., Rajcaniova, S., Munteanu, P., Dzacovska, S., & Demkova, L. (2021). CRISPR: History and perspectives to the future. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141, 111917. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111917>.
- O'connor, M., & Dahlberg, A. E. (2002). Isolation of spectinomycin resistance mutations in the 16S rRNA of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and expression in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Current Microbiology*, 45, 0429-0433. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3684-y>.
- Oany, A. R., Pervin, T., Mia, M., Hossain, M., Shahnaiz, M., Mahmud, S., & Kibria, K. K. (201۷). Vaccinomics approach for designing potential peptide vaccine by targeting *Shigella* spp. serine protease autotransporter subfamily protein SigA. *Journal Of Immunology Research*, 2017(1), 6412353. <https://doi.org/10.1155/2017/6412353>.

- World Health Organization. (2005). Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1 (ISBN 924159330X). Geneva: WHO.
- Philpott, D. J., Edgeworth, J. D., & Sansonetti, P. J. (2000). The pathogenesis of *Shigella flexneri* infection: lessons from in vitro and in vivo studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1397), 575-586. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0599>.
- Reisch, C. R., & Prather, K. L. (2015). The no-SCAR (S carless C as9 A ssisted R ecombineering) system for genome editing in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 5(1), 15096. <https://doi.org/10.1038/srep15096>.
- Richardson, C. D., Ray, G. J., DeWitt, M. A., Curie, G. L., & Corn, J. E. (2016). Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nature Biotechnology*, 34(3), 339-344. <https://doi.org/10.1038/nbt.3481>.
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M., Fischer, J., Wagenaar, J., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121-1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>.
- Samare Gholami, A., SASAN, H.A., HASHEMABADI, M., & Ravan, H.. (2020). Design and Construction of Recombinant CRISPR Vector Harboring LRRK2 Gene for Parkinson's Disease. *JOURNAL OF CELL & TISSUE*, 10(4), 214-225. SID. <https://sid.ir/paper/364460/en>. (in Persian)
- Schnupf, P., & Sansonetti, P. J. (2019). *Shigella* pathogenesis: new insights through advanced methodologies. *Bacteria and Intracellularity*, 15-39. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.bai-0023-2019>.
- Shigella* species (۲۰۰۸). In *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis* (pp. 253-265). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74537-4_15.
- Smaill, F. (2000). Antibiotic susceptibility and resistance testing: an overview. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14(10), 871-875. <https://doi.org/10.1155/2000/382415>.
- Trofa, A. F., Ueno-Olsen, H., Oiwa, R., & Yoshikawa, M. (1999). Dr. Kiyoshi Shiga: discoverer of the dysentery bacillus. *Clinical Infectious Diseases*, 29(5), 1303-1306. <https://doi.org/10.1086/313437>.