

جداسازی و کلونینگ ژن پروتئین سطحی (psp) استرپتوکوک پنومونیه در باکتری اشریشیاکلی DH5 آلفا جهت دستیابی به واکسن

هاجر باقری^۱، حمید آزادگان قمی^۲،
کیومرث امینی^۳

^۱ کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه
بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد
اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران
^۲ استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده
علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد
اراک، اراک، ایران
^۳ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده
علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد
اسلامی، ساوه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۵/۱۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۵

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکوک پنومونیه یا پنوموکوک، دیپلوکوک گرم مثبت به قطر ۰/۵ تا ۱/۲ میکرومتر، آلفا همولیتیک و تحمل‌کننده اکسیژن از جنس استرپتوکوکوس و عامل بیماری‌هایی چون مننژیت و ذات‌الریه می‌باشد. باکتری حامل ژن پروتئین سطحی (PspC) A از S بوده و هدفی امیدوارکننده برای فرمولاسیون های واکسن جدید است. به همین جهت هدف از انجام این تحقیق جداسازی و کلونینگ ژن پروتئین سطحی (psp) استرپتوکوک پنومونیه در باکتری اشریشیاکلی DH5 آلفا به منظور تهیه واکسن برای کودکان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌ها از تعداد ۱۰۰ کودک سالم، در مهد کودک های شهر اراک به طور تصادفی از نازوفارنژیال کودکان سالم زیر ۶ سال بود که در مجموع ۱۲ ایزوله پنوموکوک جداسازی شد. به منظور جداسازی و شناسایی اولیه استرپتوکوک پنومونیه از محیط کشت و آزمون های بیوشیمیایی استفاده شد و استخراج DNA صورت گرفت. از طریق آزمون PCR سویه های واجد ژن pspC شناسایی شد. ژن pspC سویه های مثبت از طریق وکتور به باکتری میزبان اشریشیاکلی الحاق و از طریق تکنیک TA کلونینگ کلون شدند و در پایان از طریق تکنیک Real time PCR میزان بیان ژن‌ها در اشریشیاکلی DH5 آلفا سنجیده و برای رسم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار clustalX و Mega5 استفاده شد.

یافته‌ها: از غربالگری نمونه های بالینی ارسالی به آزمایشگاه که براساس خصوصیات مورفولوژیک، میکروسکوپی و تست های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند در مجموع ۱۲ ایزوله پنوموکوک جداسازی شد. و از این تعداد ۱ ایزوله دارای ژن pspC بود. پس از کلونینگ، ژن های pspC، سویه های کلون شده کلنی سلکشن (آبی/سفید) جداسازی شدند. به منظور تایید نتایج کلونینگ، DNA از کلنی های مشکوک استخراج و توسط آزمون Real time PCR گردید. در نهایت تصاویر سکانسینگ، m13 و منحنی تکثیر، بیان ژن در باکتری اشریشیاکلی DH5α را تایید کرد.

نتیجه گیری: در این مطالعه با ارزیابی ژنومی پنوموکوک جدا شده از کودکان زیر ۶ سال، ژن pspC با پتانسیل ایمن سازی و به منظور ساخت واکسن از این باکتری استخراج گردید و کلونینگ با موفقیت صورت گرفت. در نهایت با بررسی درخت فیلوژنی رسم شده در این مطالعه میزان تشابه و خویشاوندی گونه استرپتوکوک پنومونیه با سایر گونه‌ها نشان داده شد.

کلمات کلیدی: استرپتوکوک پنومونیه، pspC، کلونینگ

نویسنده مسئول:

دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده
علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد
اسلامی، ساوه، ایران

۰۹۱۲۵۴۵۴۷۴

Email: Dr_kumarss_amin@yahoo.com

مقدمه

استرپتوکوک (استرپتوکوکوس) نومونیا یا پنوموکوک، دیپلوکوک گرم مثبت به قطر ۰/۵ تا ۱/۲ میکرومتر، آلفا همولیتیک و تحمل کننده اکسیژن از جنس استرپتوکوکوس است. ^۱ پنوموکوک یکی از مهم ترین باکتری های بیماری زا در انسان است. این باکتری عامل اصلی بیماری پنومونی (سینه پهلو) است. استرپتوکوک ها یک کپسول پلی ساکاریدی دارند که تعیین نوع آنها را با آنتی بادی های اختصاصی سرمی امکان پذیر می سازد. ^۲ استرپتوکوک پنومونیه همچنین عامل اصلی ذات الریه، مننژیت، سینوزیت، اوتیت (عفونت گوش میانی)، باکتری، سپسیس، مننژیت، استئومیلیت، آرتریت سپتیک، اندوکاردیت، پریتونیت، پریکاردیت، سلولیت و آبسه های مغزی است که هر ساله هزاران کودک را در سراسر جهان می کشد. از E.coli DH5 α برای کلونینگ و بیان بسیاری از ژن ها، تولید محصولات، تولید واکسن و زیست پالایی نیز استفاده شده است. ^۳

مطالعات متعدد نشان می دهد که PspC هدفی بسیار امیدوارکننده برای فرمولاسیون های واکسن جدید است. واکسن های نسل اول پنوموکوک در برگرنده ۲۳ سروتیپ رایج آنتی ژن های کپسولی این باکتری هستند. این واکسن ها در ۶۰٪ موارد پاسخ ایمنی محافظتی در بالغین ایجاد می کند و در کودکان بدلیل عدم بلوغ سیستم ایمنی محافظت قابل قبولی به وجود نمی آورد نسل دوم واکسن های پنوموک شامل انواع کونزوگه هستند که در آن آنتی ژن های کپسولی (۷ سروتیپ مختلف) با بخشی از آگزوتوکسین دیفتری کونزوگه شده است. این گروه از واکسن ها حفاظت قابل توجهی را در کودکان ایجاد می کنند. واکسن های کپسولی تنها باعث ایجاد مصونیت در برابر سروتیپ های موجود در واکسن می شوند. ^۳

یکی از فاکتورهای اصلی بیماری زا پنوموکوک، علاوه بر کپسول پلی-ساکاریدی، آنتی ژن PspC Pneumococcal (surface protein C)) می باشد که در سطح تمامی سویه های این باکتری حضور دارد و نقش مهمی در ایجاد تداخل با سیستم ایمنی میزبان، کلونیزاسیون و ایجاد عفونت توسط این باکتری را داراست. Psp یکی از سه عنوان پروتئین سطح پنوموکوک است که ژن آن تقریباً ۷۵٪ از سویه های استرپتوکوک پنومونیه وجود دارد. مطالعات مختلف نشان داده است که این پروتئین دارای اپی توپ های بسیار موثر در

ایجاد ایمنی زاپی و تولید آنتی بادی هایی مصونیت زا علیه سویه های مختلف باکتری پنوموکوک می باشد و می تواند کاندید مناسبی برای تولید واکسن موثر در برابر سویه های پنوموکوکی باشد. ^۴

استرپتوکوکوس پنومونیه به عنوان یکی از عوامل مهم مرگ و میر قابل پیشگیری توسط واکسن در سراسر دنیا است. استرپتوکوکوس پنومونیه به عنوان یکی از عوامل مهم مرگ و میر قابل پیشگیری توسط واکسن در سراسر دنیا است. واکسن های رایج پنوموکوک از آنتی ژن های کپسولی باکتری تشکیل شده اند. این واکسن ها وابسته به سروتیپ هستند و حفاظت کامل در برابر عفونت های پنوموکوکی را به وجود نمی آورند ^۵، جایگزینی سروتیپ های پنوموکوک در جمعیت واکسینه شده نیاز به واکسن های جدید با پوشش وسیع را نشان داده و تحقیقات را برای واکسن های مبتنی بر پروتئین انجام داده است. پروتئین سطحی A Pneumococcal (PspC) از S محافظت می کند. استرپتوکوکوس پنومونیه از اثر باکتریسیدال انسانی جلوگیری می کند و مانع از تشکیل لایه مکمل می گردد. ^۶

امروزه شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه در مناطقی که واکسیناسیون پنوموکوک انجام شده است عفونت های ناشی از سروتیپ های غیر واکسن شیوع بیشتری پیدا کردند ^۴، لذا تلاش های زیادی برای توسعه واکسن های مستقل از سروتیپ و بر پایه پروتئین صورت می گیرد. پروتئین های سطحی نامزد مناسبی برای ساخت این نوع واکسن ها محسوب می شوند. تا به حال تعداد زیادی از این نوع پروتئین ها در پنوموکوک شناسایی شده اند که در پروسه استقرار باکتری بکار گرفته می شوند. همسانه سازی، کلون سازی ژن یا کلونینگ مولکولی به طور عام به معنای جدا کردن یک توالی از ژنوم یک موجود و قرار دادن آن در ژنوم یا مولکول DNA موجود دیگر است ^۷، تجزیه و تحلیل ژنومی تنوع گسترده ای از توالی و نقاط اتصال نوترکیبی در پروتئین های سطح استرپتوکوک پنومونیه را نشان می دهد ^۸، لذا هدف از این پژوهش جداسازی و کلونینگ ژن پروتئین سطحی استرپتوکوک پنومونیه (psp) در باکتری اشریشیا کلی DH5 α آلفا به منظور تهیه واکسن در کودکان می باشد.

مواد و روش ها

نوع مطالعه تحقیق حاضر، مطالعه پژوهشی می باشد. نمونه ها از

ATCC) که از مرکز ذخائر ژنتیک صنعتی ایران تهیه شد و در مقایسه با تمام نمونه های مورد آزمایش به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت و در لوله های کنترل منفی به جای DNA الگو همان حجم آب دو بار تقطیر اضافه گردید.

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA باکتری از کیت استخراج DNA (کیت ذخایر مرکز ژنتیک ایران) استفاده گردید. با این کیت استخراج به روش ستونی (mini column) انجام شد.

آماده سازی پرایمرها

پس از مراجعه به سایت مطالعه و جستجو در مقالات مختلف پرایمرهای مناسب برای ژن pspC انتخاب شد^{۱۱}. پرایمرها در سایت <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> مقایسه و بلاست شدند، جهت تهیه پرایمرها به شرکت ماکروژن سفارش داده شد. پرایمرها توسط آب مقطر دیونیزه به غلظت ۱۰۰ پیکومول و سپس به غلظت مناسب که ۱۰ پیکومول بود، رسانده شد. در جدول ۱ توالی پرایمر و طول قطعه تکثیری آورده شده است، پس از استخراج DNA از استرپتوکوکوس های ایزوله شده واکنش زنجیره ای پلیمرز چندگانه با استفاده از مواد لازم و برنامه مناسب، بررسی حضور ژن pspC با پرایمرهای اختصاصی برای هر ژن صورت گرفت.

واکنش PCR

مقادیر مواد PCR برای هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix 2x (Amplicon)، ۱ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) و ۴ میکرولیتر آب مقطر بود. مراحل دمایی واکنش PCR بدین شکل انجام شد که ابتدا مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد برای ژن pspC در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت (جدول ۲).

تعداد ۱۰۰ کودک سالم، در مهد کودک های شهر اراک به طور تصادفی، پس از معاینه توسط پزشک متخصص و با اخذ رضایت نامه کتبی انتخاب شدند که طی دو هفته منتهی به مطالعه حاضر، آنتی بیوتیک مصرف نکرده بودند. در مجموع ۱۲ ایزوله پنوموکوک از نمونه های نازوفارنژیال کودکان سالم زیر ۶ سال جداسازی شد و به منظور جداسازی و شناسایی اولیه میکروارگانیسم ها از محیط کشت و آزمون های بیوشیمیایی استفاده شد^۹.

نمونه برداری با استفاده از یک سوآپ استریل نمونه بلافاصله به محیط کشت اولیه یا محیط کشت پایه انتقال داده شد. نمونه ها در محیط کشت حاوی خون گوسفند کشت داده شد. محیط کشت حاوی خون گوسفند (شرکت های مدیا - محصول کشور هندوستان) به این دلیل مورد استفاده قرار گرفت که محیط کشت حاوی خون انسان دارای مواد ضد میکروبی می باشد و باعث از بین رفتن سریع باکتری ها می شود.

کشت باکتری جهت استخراج DNA کروموزومی انجام شد که برای این کار از محیط کشت Meat Cooked (شرکت مرک - کشور آلمان) استفاده شد. پس از کشت باکتری، محیط کشت به مدت ۲۸ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و تحت فشار ۱۸ درصدی دی اکسید کربن قرار گرفت. باکتری استرپتوکوک پنومونیه از طریق تست های بیوشیمیایی و با استفاده از پرایمر های اختصاصی شناسایی شد و بر اساس مورفولوژی و میکروسکوپی و رشد در محیط های اختصاصی بررسی شده جدایه های استرپتوکوک بدست آمد. پس از تهیه لام و مشاهده باکتری در زیر میکروسکپ و اطمینان از عدم آلودگی کشت به باکتری های دیگر، سوسپانسیون جهت استخراج DNA کروموزومی استفاده شد^{۱۰}.

نمونه ها روی محیط بلاد آگار (شرکت های مدیا - محصول کشور هندوستان) و محیط های حاوی صفرا کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در جار شمع دار و در ۳۷ درجه سانتیگراد، کلنی های گرد، شفاف و کوچک با یک هاله نازک همولیز آلفا پدیدار شد. بعد از ۴۸ ساعت به واسطه خاصیت اتولیز، مرکز کلنی مقرر شد. بعضی از سوش های پنوموکوک ایجاد کلنی های مخاطی بزرگ نموده که در سطح آگار شبیه قطره روغن به نظر می رسند.

سویه استاندارد مورد مصرف در این تحقیق

استرپتوکوکوس آلفا همولیتیک با شماره ۱۴۴۷ PTCC (۸۶۶۸)

جدول ۱: پرایمر های مورد استفاده^۹ در این پژوهش

سایز	توالی پرایمر	ژن
۷۵۰	5'-AAG ATG AAG ATC GCC TAC GAA CAC-3'	pspC Forward
۷۵۰	5'-AATGAG AAA CGA ATC CTT AGC AAT G-3'	pspC Revers

جدول ۲: برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR

مرحله	دما (درجه سلسیوس)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۱۸۰	-
واسرشت	۹۵	۳۰	-
اتصال	۵۹	۳۰	-
بازآرایی (گسترش)	۷۲	۶۰	۳۵
بازآرایی (گسترش نهایی)	۷۲	۳۰۰	-

الکتروفورز محصولات PCR یا DNA با ژل آگاروز

برای الکتروفورز DNA از ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده می شود. قطعات DNA حاصل از استخراج یکسان نبوده و دارای طول های متفاوتی می باشند که اندازه قطعات ماده ژنتیکی اهمیت دارد و جهت جداسازی آن ها از دستگاه الکتروفورز استفاده شد. مواد با مولکول ها براساس بارالکتریکی خود به سمت قطب های مخالف حرکت می کنند. DNA به علت داشتن گروه های فسفات در اسکلت خود دارای بار منفی است. این بار منفی سبب می شود که وقتی قطعات DNA را بر روی ژل بارگذاری کنیم و جریان الکتریکی را وصل کنیم، قطعات DNA به سوی قطب مثبت (آند - قرمز) حرکت کنند. فاصله طی شده توسط قطعات DNA پس از یک زمان مشخص؛ به طول قطعات (و در نتیجه جرم آن ها) بستگی دارد زیرا با توجه به این که بار آن ها یکسان است، حرکت آن ها در ژل بر اساس وزن مولکولی آن ها بوده و بر همین اساس جدا می شوند. در کنار نمونه ها در ژل، همواره یک نمونه مارکر که حاوی قطعات DNA با وزن مولکولی مشخص است قرار می دهند که با توجه به آن می توان وزن قطعات نمونه مجهول را تشخیص داد.

کلون کردن ژن pspC در باکتری اشریشیاکلی اوریکا میگ

در حالی که PCR بعنوان روشی برای تولید مقادیر بالا یک قطعه دلخواه جایگزین کلونینگ شده است، اما در موارد خاص کلونینگ DNA تکثیر شده بوسیله PCR ضروری می باشد. بعنوان مثال تکنیک های معینی همانند سنتز پروتئین در *in vitro* با وارد سازی قطعه DNA به داخل یک وکتور پلاسمیدی یا فاژی مناسب بهتر بدست می آید، روش های کلونینگ برای محصولات PCR بطور تقریبی اجازه کلونینگ قطعات DNA بدست آمده از دست کاری های متداول DNA را هم بصورت انتهای صاف و هم چسبنده فراهم می نماید. DNA پلی مرزهای مقاوم به حرارت همانند DNA Taq منجر می شوند که محصولات PCR در انتهای ۳' خود یک باقیمانده آدنین تنها را دارا باشند.

واکنش بوسیله DNA لیگاز همانند واکنش های لیگاسیون رایج کاتالیز می شود. همچنین امکان انجام کلونینگ انتهای چسبنده با محصولات PCR وجود دارد. در این حالت پرایمرهای الیگونوکلوئیدی که حاوی یک جایگاه اندونوکلاز تحدیدی در داخل خود می باشند، طراحی می شوند. با توجه به اینکه مکمل بودن پرایمرها ضرورتا باید در انتهای ۳' آن ها باشد و در نتیجه انتهای ۵'

مقاومت به ژن pspC بودند) که در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند (در ۰,۶-۰,۴ OD600= مورد استفاده قرار گرفت^{۱۳}).

انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز Real-Time-PCR

واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت شرکت (Genet bio CAT. NO: Q9210) کره جنوبی به صورت زیر انجام شد:

۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green 5, Depc water از یک میکرولیتر از پرایمر فوروارد، یک میکرولیتر از پرایمر ریورس، یک میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از CDNA استفاده شد. تکثیر قطعه های موردنظر در دستگاه Corbet با برنامه دنا تراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی sr RNA ۱۶ بعنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. سپس برای محاسبه میزان بیان ژنی pspC و رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزار مشخص و مقدار بیان ژن هدف محاسبه شد. آنالیز میزان بیان با اندازه گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با سویه استاندارد انجام شد^{۱۴,۱۳}.

رسم درخت فیلوژنی

تجزیه تحلیل نتایج حاصل از توالی یابی توالی های به دست آمده توسط نرم افزار BioEdit بررسی گردید. بعد از اطمینان از صحت توالی های به دست آمده از دو رشته توالی یابی شده مستقیم و معکوس توسط نرم افزار DNA Baser رشته واحدی (از ۵' به ۳') مرتب شد. توالی های حاصله با جدایه های ثبت شده در NCBI مقایسه شدند. هر توالی به طور جداگانه توسط نرم افزار Blast n در بانک ژن جستجو شد و توالی های حاصل از Blast توسط نرم افزار W Clustal هم ردیف شدند^{۱۵}، آنالیز فیلوژنتیکی پس از همردیف نمودن توالی ها توسط نرم افزار W Clustal، با استفاده از برنامه های ۱۰/۵ MEGA درخت های فیلوژنتیکی ترسیم شدند. درخت های تهیه شده با استفاده از روش الحاق ترسیم MEGA 5.10 برنامه در Neighbor Joining همسایه

پرایمر ناحیه ای است که جایگاه آنزیم تحدیدی قرار داده می شود. این عمل با توجه به اینکه کارایی هضم با اندونوکلاز تحدیدی معین را در صورتی که نوکلئوتید های اضافی در انتهای ۵' کم باشد، کاهش می یابد نیازمند طراحی دقیق می باشد و در صورت طراحی دقیق پرایمر در این حالت واکنش های هضم و لیگاسیون مشابه با واکنش های متداول انجام می گیرد. در این پژوهش از تکنیک TA-Clonig استفاده گردید.

غربالگری سفید/آبی به منظور تایید صحت کلونینگ

همانطور که پیش تر نیز گفته شد وکتور کلونینگ بکار رفته در این روش PTG19-T دارای ژن Lac z می باشد، چون MCS وسط Lac z قرار گرفته است اگر قطعه ای وارد وکتور شود ژن Lac z تخریب می شود. در محیط کشت X-gal که آنالوگ لاکتوز است و IPTG که القاگر پروموتور Lac z وجود دارد، در نتیجه ژن pspC باکتری فعال بوده و از X-gal استفاده کرده و کلنی آبی تشکیل می شود. اگر ژن مورد نظر ما وارد وکتور شده باشد ژن Lac z تخریب شده و pspC غیرفعال شده است در نتیجه باکتری نتوانسته از X-gal استفاده کند و کلنی های سفید در محیط کشت تشکیل می شود. در نتیجه تشکیل کلنی های سفید نشان دهنده این است که ژن مورد نظر ما با موفقیت کلون شده است. بعلاوه چون محیط دارای آمپی سیلین می باشد، کلنی هایی که می توانند در محیط رشد کنند در حقیقت نشان دهنده دریافت پلاسמיד حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین است.

تعیین میزان بیان ژن pspC با روش Real time PCR

قبل از انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز باکتری نو ترکیب انکوبه گذاری می شود. پس از ۱۵ ساعت انکوبه گذاری (Late log phase) بهترین مرحله برای استخراج RNA است. پس از گذشت ۱۵ ساعت استخراج RNA به شرح ذیل انجام شد^{۱۲}.

استخراج RNA

برای این منظور از RNA کلی برای واکنش های تکثیر پرایمر استفاده شد. برای استخراج RNA از میکروکیت RNeasy (شرکت Qiagen) استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی (باکتری های واجد ژن

گردید. به منظور ترسیم هیستوگرام مربوط به نمایش نمودار فواصل درون گونه ای پس از تعیین فواصل نوکلوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم افزار Excel، نمودار مربوطه رسم شد.

در خصوص تعیین هویت جدایه ها به شرح ذیل می باشد. نتایج در جدول ۳ آورده شد.

نتایج استخراج DNA

پس از استخراج DNA غلظت DNA در نمونه های استخراج شده با استفاده از روش فلورومتر بررسی شد و استخراج آن مورد تایید قرار گرفت. شکل (۱)

نتیجه آزمون PCR به منظور شناسایی و کلون ژن pspC

واکنش PCR برای ژن های pspC با پرایمر ذکر شده انجام شد. تصاویر (۲)، نتایج واکنش PCR را در ۱۲ ایزوله استرپتوکوکوس پنومونه جدا شده نشان می دهد. در این تصاویر می توان باند های مربوط به ژن های مختلف را در سویه های جدا شده مشاهده کرد. جهت بررسی اختصاص روش تشخیصی مورد استفاده در این تحقیق واکنش PCR از آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد و از نمونه های مورد آزمایش به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

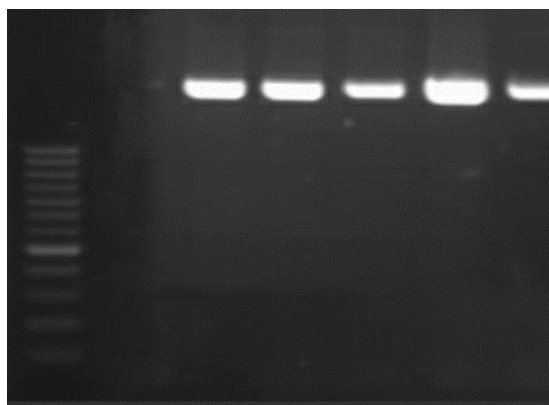
یافته ها

در مجموع از ۱۰۰ نمونه تحت بررسی ۱۲ نمونه استرپتوکوکوس پنومونه شناسایی شد پس از انجام تست های تشخیصی تفریقی، جداسازی و شناسایی شد. کوکسی های گرم مثبت استرپتوکوکوس پنومونه به صورت منفرد و زنجیر وار در محیط کشت با رنگ آمیزی گرم به رنگ صورتی- قرمز مشاهده شدند. همچنین نتیجه تست کاتالاز در مورد استرپتوکوکوس پنومونه منفی بوده و تست همولیز به صورت هاله روشن اطراف کلنی باکتری به- صورت همولیز آلفا مشخص شد. بعد از شناسایی سویه پنومونه استخراج DNA توسط کیت صورت گرفت و از طریق الکتروفورز کوتاه تایید شد.

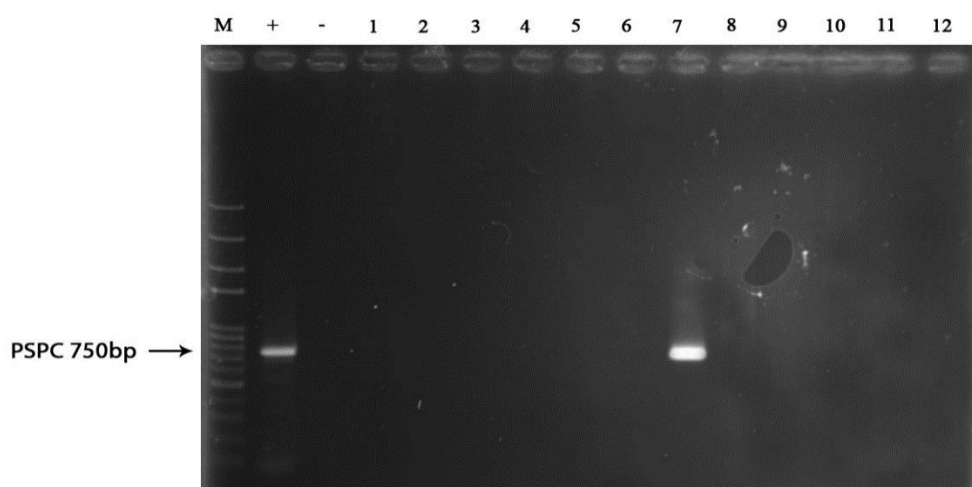
نتایج تعیین هویت بر اساس تست های بیوشیمیایی بررسی نتایج تست های بیوشیمیایی مورد نظر طبق بند روش کار

جدول ۳: نتایج تستهای بیوشیمیایی استرپتوکوک پنومونه

تست بیوشیمیایی		تست بیوشیمیایی		تست بیوشیمیایی	
تست اندول	-	تست سیتрат	+	هیدرولیز ژلاتین	+
متیل رد	+	تست دی ان آز	+	لاکتوز	+
تست اوره آز	-	تست احیای نیترات	-	سوربیتول	-



شکل ۱: نتیجه تست تایید استخراج DNA



شکل ۲: نتیجه PCR ژن های pspC



شکل ۳: نتایج کلون سلکشن (کلنی آبی و سفید) ژن آنزیم pspC

(آبی/سفید) سویه های کلون شده جداسازی شدند (شکل ۳).

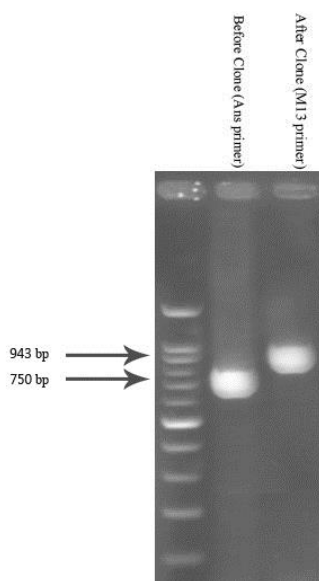
تایید نتایج کلون بوسیله PCR و سکانس

به منظور تایید نتایج کلون، DNA از کلنی های مشکوک استخراج شده و توسط آزمون PCR و در نهایت با سکانس محصول PCR، ورود ژن های pspC به باکتری اشریشیاکلی DH5 α تایید شد که در شکل های (۴) قابل رویت است.

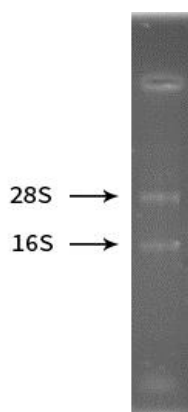
همانطور که در مارکر تصاویر حاصل از PCR مشاهده می شود باند ۷۵۰ bp که نشان دهنده ژن pspC می باشد و از ۱۲ سویه استرپتوکوکوس پنومونیه جدا شده، ۱ (۸/۳٪) سویه واجد ژن pspC بود. (جدول ۳)

نتایج حاصل از کلونینگ ژن pspC

پس از کلون کردن ژن های pspC توسط کلنی سلکشن



شکل ۴: تایید کلونینگ توسط PCR با پرایمر های M13 وکتور و سکانس آن



شکل ۵: تایید استخراج RNA

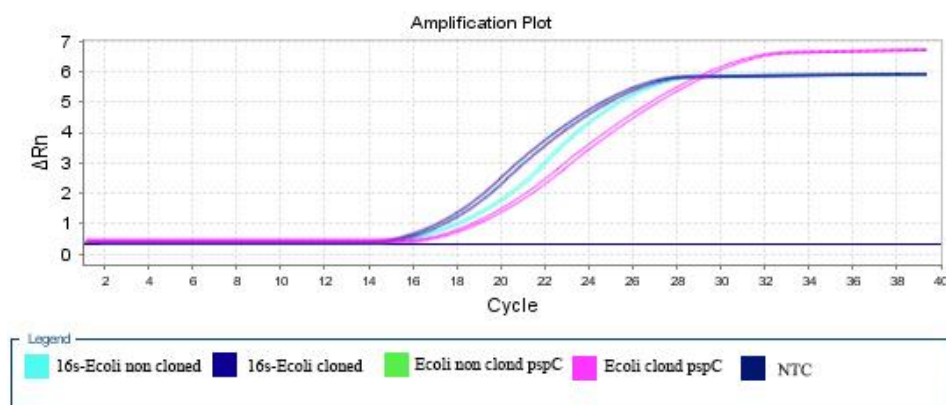
تایید کلونینگ و محل ایجاد جانکشن کلونینگ

و در نهایت محصول PCR برای سکانس به شرکت Bioneer ارسال گردید و BLAST شد. نتیجه سکانس و بلاست در شکل ۸-۹.

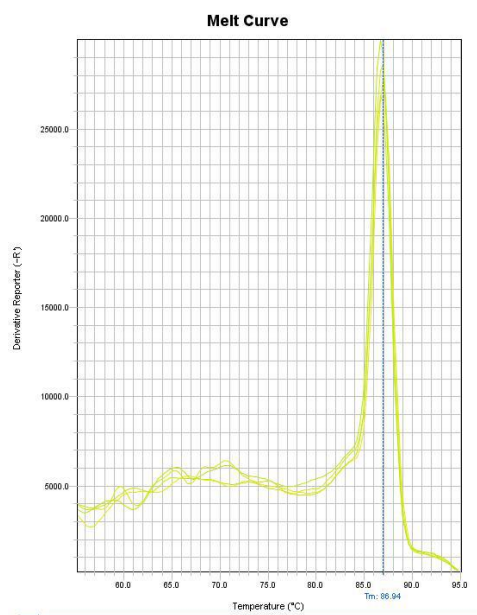
نتیجه تایید استخراج RNA

به منظور تایید نتایج کلونینگ، RNA کلنی های مشکوک استخراج شده و cDNA ساخته شد، نتیجه تایید استخراج RNA در شکل (۵) قابل مشاهده است.

نتایج بررسی بیان *pspC* کلون شده بوسیله Real time PCR به منظور تایید نتایج کلونینگ RNA کلنی های مشکوک استخراج شده و cDNA ساخته شد و توسط آزمون Real time PCR میزان بیان ژن *pspC* بررسی شد.



شکل ۶: نتایج منحنی تکثیر Real Time PCR

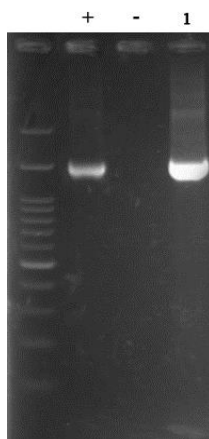


شکل ۷: نتایج منحنی ذوب Real time PCR

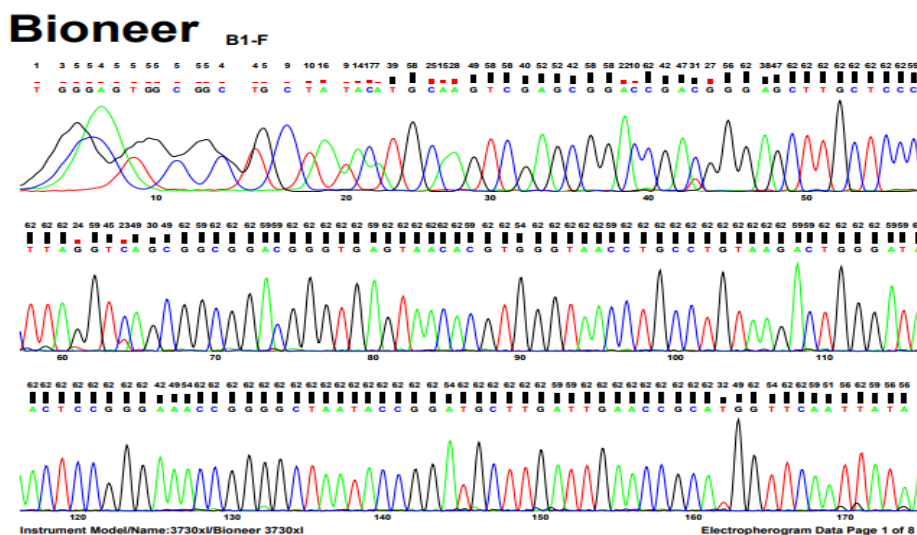
در نهایت محصول PCR برای سکانس به شرکت Bioneer ارسال گردید و BLAST شد (نتیجه سکانس و بلاست در شکل ۶)

تعیین هویت مولکولی جنس استرپتوکوکوس

به منظور تعیین هویت مولکولی جنس استرپتوکوکوس از پرایمرهای عمومی 16s استفاده گردید (نتیجه PCR در شکل ۴-۵) و



شکل ۸: نتیجه آزمون PCR با پرایمرهای عمومی 16s به منظور تعیین هویت مولکولی جنس استرپتوکوکوس

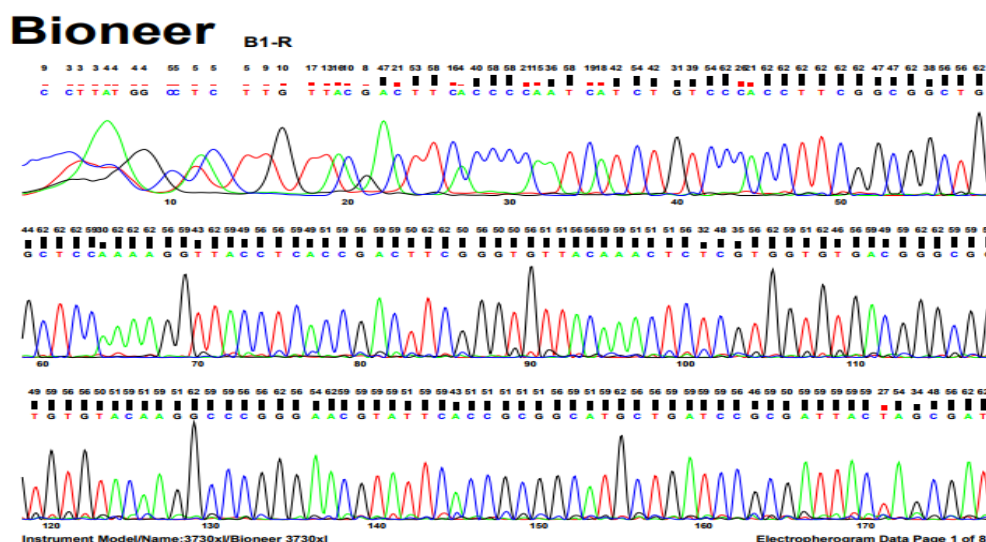


شکل ۹: نتیجه سکانسینگ و بلاست *pspC* Forward

نتایج سکانسینگ حاصل از کلونینگ ژن *pspC*

توالی های به دست آمده توسط نرم افزار Edit Bio بررسی گردید. توالی های حاصله با جدایه های ثبت شده در NCBI مقایسه شدند. هر توالی به طور جداگانه توسط نرم افزار Blast n در بانک ژن

جستجو شد و توالی های حاصل از Blast توسط نرم افزار Clustal W هم ردیف شدند. با سکانس محصول PCR بیان ژن *pspC* در باکتری اشريشياکلی DH5 α تایید شد (شکل ۹ و ۱۰).



شکل ۱۰: نتیجه سکانسینگ و بلاست Revers pspC

نتایج رسم درخت فیلوژنی

برای رسم درخت فیلوژنی از نرم افزار clustalX و Mega5 استفاده شد. در این مرحله از روش neighbor joining برای رسم درخت استفاده شد. بررسی درخت فیلوژنی گونه های مورد مطالعه و مقایسه با گونه های مشابه در بخشی از تحقیق حاضر، روابط فیلوژنتیکی بین گونه های استرپتوکوکوس با استفاده از ژن SrDNA مورد بررسی قرار گرفت. نتایج درخت فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) نشان می دهد که سایر گونه های استرپتوکوک با گونه پنومونیه با در یک کلاذ (خوشه) قرار گرفتند که بیانگر رابطه خویشاوندی نزدیک آن ها با هم بود (شکل ۱۰ و ۹).

بحث

پنوموکوک یکی از مهم ترین باکتری های بیماری زا در انسان است. این باکتری عامل اصلی بیماری پنومونی (سینه پهلوی) استرپتوکوک ها یک کپسول پلی ساکاریدی دارند که تعیین نوع را با آنتی بادهای اختصاصی سرمی امکان پذیر می سازد. استرپتوکوک پنومونیه همچنین عامل اصلی ذات الریه، مننژیت، سینوزیت، اوتیت (عفونت گوش میانی)، باکتری می، سپسیس، مننژیت، استئومیلیت،

آرتریت سپتیک، اندوکاردیت، پریتونیت، پریکاردیت، سلولیت و آبسه های مغزی است که هر ساله هزاران کودک را در سراسر جهان می کشد^{۱۶}، یکی از فاکتورهای اصلی بیماری زایی پنوموکوک، علاوه بر کپسول پلی ساکاریدی، آنتی ژن PspC Pneumococcal ((surface protein C)) می باشد که در سطح تمامی سویه های این باکتری حضور دارد و نقش مهمی در ایجاد تداخل با سیستم ایمنی میزبان، کلونیزاسیون و ایجاد عفونت توسط این باکتری را داراست. Psp یکی از سه عنوان پروتئین سطح پنوموکوک است که ژن آن تقریباً در ۷۵٪ از سویه های استرپتوکوک پنومونیه وجود دارد. مطالعات مختلف نشان داده است که این پروتئین دارای اپی توپ های بسیار موثر در ایجاد ایمنی زایی و تولید آنتی بادی هایی مصونیت زا علیه سویه های مختلف باکتری پنوموکوک می باشد و می تواند کاندید مناسبی برای تولید واکسن موثر در برابر سویه های پنوموکوک باشد^{۱۷}.

در مطالعه اکبری و همکاران، سکانس ژنی PspA (B1-5) در وکتور Puc57 بصورت کدون اپتیمایز شده سنتز گردید و سپس به وکتور بیانی pET-15b که دارای ژن مقاومت به آمپی سیلین است انتقال داده شد. قطعات ژنی و وکتور با آنزیم های محدودالانر ویژه بریده شد و پس از اتصال و تبدیل از حالت خطی به حلقوی، در

نهایت با روش ترانسفورماسیون بیوشیمیایی ماده کلرید کلسیم *cacl2* وارد باکتری *E.coli* سوش 'TOP10F' گردید. ترانسفورماسیون مجدد سازه های ژنی به میزبان بیانی *E.coli* سویه Rosetta انجام شده و تایید ورود قطعات در هر مرحله توسط فرآیند PCR و هضم آنزیمی انجام گرفت. بیان قطعات ژنی PspA در باکتری *E.coli* Rosetta انجام و توسط تکنیک SDS-PAGE به اثبات رسید. تخلیص پروتئین های نوترکیب بیان شده با روش کروماتوگرافی HisPur Ni-NTA Resin با استفاده از His-Tag انتهای پروتئین انجام شده و سپس با تکنیک وسترن بلات تایید گردید. جهت تایید نهایی پروتئین های نوترکیب مذکور همچنین از آنتی بادی پلی کلونال تولید شده علیه ۳ سوش مختلف پنوموکوک استفاده گردید. همچنین بررسی قابلیت این آنتی بادی ها در اتصال به سطح سویه های پنوموکوک متعلق هر دو خانواده PspA نیز بوسیله ی تست الایزا سنجیده شد^{۱۸}.

در مطالعه پرویزی و همکاران، در مجموع ۴۳ ایزوله استرپتوکوکوس پنومونیه از نمونه های نازوفارنژیال کودکان سالمی که در سال ۱۳۹۲ به مهدکودک های شهرستان اردبیل مراجعه کرده بودند، جدا شد. ایزوله ها در ابتدا توسط آزمایشات فنوتیپی مانند حساسیت به اپتوجین و حلالیت در صفرا شناسایی شدند. سپس توسط ردیابی ژن کد کننده آنتی ژن کپسولی *cpsA* تایید شدند. برای ردیابی ژن های *pspC*، *phtD*، *phtE* و *rrgA* از روش PCR استفاده شد. در ۸۴/۴ درصد ایزوله ها حداقل یکی از ژن های مورد مطالعه ردیابی شد. ژن های *pspC*، *lytA*، *phtE* و *phtD* به ترتیب در ۷۰، ۶۰، ۳۹/۵ و ۳۵ و ۲۵/۵٪ ایزوله ها شناسایی شدند^۹. نتایج این مطالعه نشان داد که ژن های مورد مطالعه به طور یکنواخت در میان ایزوله ها وجود ندارند و برای بدست آوردن یک واکسن پنوموکوک با پوشش حفاظتی کامل بایستی از مجموعه ای از این آنتی ژن ها استفاده شود که با تحقیق حاضر در یک راستا است.

غلامحسینی مقدم و همکاران تعداد ۲۶۰ سوپ از ناحیه نازوفارنکس کودکان ۱ ماهه تا ۶ ساله در ۴ گروه سنی در شهرستان مشهد جمع آوری گردید. در این نمونه ها، جدایه های استرپتوکوک پنومونیه با آزمایش های بیوشیمیایی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند. از روش PCR جهت بررسی حضور ژن های *lytA*، *rrgA* و *pspC* در جدایه ها استفاده شد. سروتایپینگ جدایه ها با استفاده از روش Multiplex PCR انجام گردید. نتایج نشان داد که ۵۹ جدایه به

عنوان استرپتوکوک پنومونیه تایید شد. در میان این جدایه ها استرپتوکوک پنومونیه ۵۰ جدایه (۸۴/۷۴٪)، ۱۹ جدایه (۳۲/۲۰٪) و ۲ جدایه (۳/۳۸٪) به ترتیب واجد ژن های *rrgA*، *lytA* و *pspC* بودند. تفاوت آشکاری در بین ۴ گروه سنی کودکان براساس جنس در کلونیزه شدن استرپتوکوک پنومونیه وجود نداشت. سروتیپ ۶ A/B دارای بیشترین فراوانی در بین گروه های سنی بود. بیشترین جدایه ها در گروه سنی ۷۲-۵۴ ماهه وجود داشتند. این مطالعه نشان دهنده میزان بالای ناقلین پنوموکوک در ناحیه نازوفارنکس کودکان با سن ۵۴-۷۲ ماهه در مشهد می باشد^{۱۹}، بنابراین مطالعات اپیدمیولوژیکی می تواند، سروتیپ های شایع در ناقلین را مشخص نماید که این مسئله در تولید واکسن موثر بر علیه پنوموکوک مفید است.

در مطالعه Abdollahi و همکاران، ۵ ژن پروتئین کننده سطحی شامل *phtD*، *pspC*، *phtE*، *lytA* و *rrgA* در جدایه های *Streptococcus pneumoniae* جمع آوری شده از ۴ مرکز مراقبت اصلی و مرکز پزشکی کودکان در تهران مورد ارزیابی قرار گرفتند، تعداد ۳۰۰ نمونه سوپ نازوفارنکس از کودکان زیر ۶ سال جمع آوری شد. شناسایی جدا شده های پنومونیه با استفاده از تست های بیوشیمیایی مورد تأیید و PCR برای حضور ژن *pspC* انجام شد. وجود ژن *phtD*، *phtE*، *pspC*، *lytA* و *rrgA* با استفاده از روش های تقویت PCR مورد بررسی قرار گرفت. از ۳۰۸ سوپ بینسفرانژال، ۱۰۲ جدایه استرپتوکوک پنومونیه با استفاده از آزمایشات تایید شدند. از بین این جدا شده ها، ۸۷ (۸۵/۲٪)، ۵۴ (۵۲/۹٪)، ۵۱ (۵۰٪)، ۴۳ (۴۲/۱٪) و ۳۱ (۳۰/۳٪) از نظر ژن های *pspC*، *phtE*، *rrgA*، *lytA* و *phtD* مثبت بودند^۴. این مطالعه که *pspC* یکی از مهم ترین گونه های پنومونیه و از مهم ترین نشانگرهای ژنتیک برای اهداف تشخیصی است. این یافته ها می تواند در طراحی مطالعات بیشتر در مورد واکسن علیه *S. pneumoniae* در کشور ما بسیار مفید باشد و با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

M. Georgieva و همکاران، در این مطالعه، به بررسی اهمیت بیولوژیکی تنوع توالی پروتئین های سطحی پنوموکوک مرتبط با دیواره سلولی در باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه و آنتی ژن پروتئینی سطحی (*pspA*) پرداخته شد. با استفاده از تنوع آلی *pspA* مشاهده شده در یک مجموعه بزرگ پنوموکوک، حضور و فراوانی ژن های *psp* بررسی شد و تنوع آنتی ژنی آن ها پایش شد. در این بررسی

۵۴٪ از سویه‌ها هر ۴ ژن خانواده pht داشتند. در بخش دیگر این مطالعه فراوانی ژن rrgA در ایزوله‌های پنوموکوک مورد مطالعه قرار گرفت. این ژن کد کننده زیر واحد RrgA پیلای پنوموکوک می‌باشد. پیلای در پنوموکوک از سه زیر واحد رشته ای (RrgA, RrgB, RrgC) تشکیل شده است. از میان آن‌ها زیر واحد RrgA نقش مهمتری در اتصال باکتری به سلول‌های اپیتلیال دارد بطوری که موتانت‌هایی که قادر به تولید آن نیستند از قدرت عفونت زایی کمتری در مقایسه با سویه‌های اجدادی برخوردارند. نتایج این مطالعه نشان داد که تنها ۲۵/۵٪ ایزوله‌ها حاوی ژن rrgA بودند. در مطالعه مشابه دیگری این ژن در ۲۷٪ ایزوله‌های پنوموکوک شناسایی شده بود.^{۲۲}

در مطالعه Maria Lintgesa و همکاران، دو مجموعه PCR چندتایی برای شناسایی این ۱۱ ژن SAg انجام گرفت. این گروه اول شامل 5 + spea13, spea, spec, spej, spek و spel است. گروه دوم شامل spea14, speh, spem, spei, ssa و smeز حضور ژن‌های Streptococcus pyogenes SAg می‌تواند به سرعت با استفاده از Real time PCR شناسایی شود روش با SYBR-Green، در نتیجه ارائه یک ابزار عالی در تشخیص بالینی است^{۲۳، ۲۴}، پس از آزمایش بیش از ۳۰۰ نمونه بالینی جدایه‌ها، یک سویه بدون سوپراژنتی ژن شناسایی شد و به منظور ساخت واکسن جدا سازی شد که با تحقیق حاضر تناسب دارد. در پایان درخت فیلوژنی به منظور بررسی گونه انتروکوک‌تریسیم گردید.

نتیجه گیری

استرپتوکوکوس پنومونیه از جمله باکتری‌های بیماری‌زا و عامل بیماری‌های تنفسی، ذات‌الریه، مننژیت در افراد جامعه بالانحص کودکان می‌باشد. در مطالعه حاضر و نتایج بدست آمده با توجه به توانایی ژن pspC، که یک ژن مهم از نظر تحقیقات مطرح در زمینه ایمونولوژی و دارای قدرت بالقوه برای تحریک پاسخ‌های ایمنی است، جداسازی و کلونینگ ژن pspC جدا شده از پنوموکوک در باکتری اشرشیاکلی DH5α صورت گرفت تا بتوان به منظور تأمین نیازهای درمانی و در تهیه واکسن از آن بهره جست، از تعداد ۱۲ ایزوله استرپتوکوکوس پنومونیه، ۱ سویه حامل ژن pspC بود، ژن

طیف عملکرد بیولوژیکی را در بین انواع متنوع pspA مشخص گردید و نشان داده شد که تنوع توالی pspA نشان دهنده تفاوت‌های عملکردی بوده و از این تنوع توالی در pspA می‌توان برای ساخت و تهیه واکسن به منظور تقویت سیستم ایمنی استفاده گردد^{۲۵}، به طور کلی، نتایج مطالعات ما بینشی در مورد پیامدهای کاربردی تنوع توالی پروتئین و نقش ایمنی گونه خاص در نگهداری آن ارائه می‌دهد. Stiwen و همکاران، آنتی بادی‌های مونوکلونال در برابر پروتئین سطح پنوموکوک (PspA) نشان داده شد که موش‌ها را از عفونت کشنده پنوموکوک محافظت می‌کند. PspA از نظر سرولوژیکی بسیار متغیر است و این احتمال وجود دارد که PspA از یک سویه نتواند پاسخ‌های محافظتی را در برابر سویه‌هایی دیگری که دارای PspA سرولوژیکی متفاوت هستند ایجاد کند. این یافته نشان داد که PspA می‌تواند در صورت عدم وجود سایر آنتی ژن‌های پنوموکوک پاسخ ایمنی ارائه کند. ایمنی ایجاد شده احتمالاً به واسطه آنتی بادی تولید شده است زیرا می‌تواند به صورت واکسن ارائه شود^{۲۶}، تولید دیگر پروتئین‌های پنوموکوک (غیر از PspA) نتوانست محافظت در برابر عفونت کشنده پنوموکوک را ایجاد کند که با تحقیق این مطالعه حاضر هم راستاست.

Muneki Hotomi و همکاران، در مجموع ۲۵۱ ایزوله پنومونیه از بیمارانی که به دنبال درمان عفونت‌های دستگاه تنفسی فوقانی بودند به دست آمد، در بین ۲۵۱ پنوموکوک مورد مطالعه، اکثریت (۴۹/۴٪) دارای ژن PspA 2 بودند، از نظر سن، جنس بیمار، منبع جدایه‌ها یا حساسیت جدایه‌ها به پنی سیلین G، فراوانی حضور ژن mefA و سروتیپ‌های B15 و F ۱۹ از نظر آماری نسبت به ژن PspA2 شایع تر بود. اکثریت قریب به اتفاق پنوموکوک جدا شده از مایعات گوش میانی، ترشحات بینی / آسپیرات سینوس یا ترشحات حلق واجد ژن PspA 1 و ۲ هستند^{۲۱}، بررسی‌ها نشان داد یک واکسن حاوی PspA به طور بالقوه می‌تواند پوشش بالایی در برابر بیماری‌های عفونی پنوموکوک ایجاد کند، زیرا در مقابل اکثر پنوموکوک‌هایی که کودکان و بزرگسالان را آلوده می‌کنند ایمنی ایجاد کرده که موارد بالا همسو با نتایج حاصل از این پژوهش است.

Rioux S و همکاران ۲۰۱۱، در مطالعه مشابه در آمریکا نیز نشان داده شده که در ۱۰۷ سویه پنوموکوک مورد مطالعه ۱۰۰٪ سویه‌ها دارای ژن phtD و ۹۷٪ سویه‌ها حاوی ژن phtE بودند.

موثر در تهیه واکسن خواهد بود. درخت فیلوژنی رسم شده در این تحقیق میزان تشابه و خویشاوندی استرپتوکوکوس پنومونیه را با سایر گونه‌ها نشان داد.

مذکور از طریق پلاسمید ptg19 به باکتری میزبان منتقل و کلونینگ با موفقیت انجام شد. این پروتئین نوترکیب، پتانسیل استفاده در ایمنی‌زایی و ساخت واکسن را دارا می‌باشد و زمینه ساز مطالعات

Reference

1. Engl C, Jovanovic G, Lloyd LJ, et al. In vivo localizations of membrane stress controllers PspA and PspG in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 2009;73(3): 382-96.
2. Jovanovic G, Mehta P, McDonald C, et al. The N-terminal amphipathic helices determine regulatory and effector functions of phage shock protein A (PspA) in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* 2014;426(7): 1498-511.
3. Hotomi M, Togawa A, Kono M, et al. PspA family distribution, antimicrobial resistance and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolated from upper respiratory tract infections in Japan. *PLoS One* 2013;8(3): e58124.
4. Abdollahi S, Siadat SD, Shapouri R, et al. Antibiotic Susceptibility and Prevalence of Adhesion Genes in *Streptococcus pneumoniae* Isolates Detected in Carrier Children in Tehran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2018;11(6).
5. Georgieva M, Kagedan L, Lu Y-J, et al. Antigenic variation in *Streptococcus pneumoniae* PspC promotes immune escape in the presence of variant-specific immunity. *MBio* 2018;(9)2.
6. Rioux S, Neyt C, Di Paolo E, et al. Transcriptional regulation, occurrence and putative role of the Pht family of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 2011;157(2): 336-48.
7. Jedrzejewski M. Unveiling molecular mechanisms of bacterial surface proteins: *Streptococcus pneumoniae* as a model organism for structural studies. *Cellular and molecular life sciences* 2007;64(21): 2799-822.
8. Mitchell A, Mitchell T. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clinical Microbiology and Infection* 2010;16(5): 411-8.
9. Parvizi, Mousavi, Allah S, et al. Distribution of genes encoding five protein antigens in *Streptococcus pneumoniae* isolates isolated from healthy children Ardabil, Iran. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences* 2016; 16 (3): 251-60.
10. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. *Textbook of diagnostic microbiology-E-Book*: Elsevier Health Sciences; 2018.
11. Fakhari AR, Salehi P, Heydari R, et al. Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. *Journal of Chromatography A* 2005;1098(1-2): 14-8.
12. Gerlach D, Yu C, Ferretti J. Inactivation of the streptococcal erythrogenic toxin B gene (speB) in *Streptococcus pyogenes*. *Infection and immunity* 1993;61(9): 3719-23.
13. Farivar AS, Nowroozi J, Eslami G, et al. The study of antibiotic resistance among *Klebsiella pneumoniae* and expression level of *oqxA* and *acrA* genes by using real-time PCR. *Res Med* 2016;40(1): 42-8.
14. Davis R, Mauer L. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology* 2010;2: 1582-94.
15. Baker B, Bokth S, Powles A, et al. Group A streptococcal antigen-specific T lymphocytes in guttate psoriatic lesions. *British Journal of Dermatology* 1993;128(5): 493-9.
16. Ahmady-Asbchin S, Nasrolahi Omran A, Jafari N, et al. Antibacterial effects of *Lavandula stoechas* Essential Oil, on Gram Positive and Negative Bacteria. *Medical Laboratory Journal* 2012;6(2): 35-41.
17. Amenabar I, Poly S, Nuansing W, et al. Structural analysis and mapping of individual protein complexes by infrared nanospectroscopy. *Nature communications* 2013;4(1): 1-9.
18. Shamami Q, Mirzaei, Pirayeh N, Shahin. Abundance of *papA*, *papC* genes and pattern of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection. *Journal of Microbial World* 2016; 9 (No. 1 (26th consecutive)): 44-52.
19. Nima Aah, Fallah F, Tabatabai Sar. Determination of *psaA* factor in *Streptococcus pneumoniae* isolated from nasopharynx of healthy children by PCR. 2017.
20. Quinn A, Kosanke S, Fischetti VA, et al. Induction of autoimmune valvular heart disease by recombinant streptococcal M protein. *Infection and immunity* 2001;69(6): 4072-8.

21. Arai J, Hotomi M, Hollingshead SK, et al. Streptococcus pneumoniae isolates from middle ear fluid and nasopharynx of children with acute otitis media exhibit phase variation. Journal of clinical microbiology 2011;49(4): 1646-9.
22. Rioux S, Martin D, Ackermann H-W, et al. Localization of surface immunogenic protein on group B streptococcus. Infection and immunity 2001;69(8): 5162-5.
23. Lintges M, van der Linden M, Hilgers R-D, et al. Superantigen genes are more important than the emm type for the invasiveness of group A Streptococcus infection. The Journal of infectious diseases 2010;202(1): 20-8.
24. Sánchez-Encinales V, Ludwig G, Tamayo E, et al. Molecular Characterization of Streptococcus pyogenes Causing Invasive Disease in Pediatric Population in Spain A 12-year Study. The Pediatric infectious disease journal 2019;38(12): 1168-72.

Hajar Bagheri¹, Hamid Azadegan Qomi², Kiamars Amini^{3*}

¹ Master of Microbiology, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran

² Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran

³ Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Isolation and Cloning of Streptococcus Pneumoniae Surface Protein (PSP) gene in Escherichia Coli DH5 Alpha to Obtain Vaccine

Received: 9 Aug 2021 ; Accepted: 26 Nov 2021

Abstract

Background and Aim: Streptococcus pneumoniae or pneumococcus, gram-positive diplococcus with a diameter of 0.5 to 1.2 μm , alpha hemolytic and oxygen tolerant of Streptococcus and causes diseases such as meningitis and pneumonia. The bacterium carries the Pneumococcal A surface protein gene (*PspA*) from S, and several studies show that PspA is a very promising target for new vaccine formulations. Therefore, the aim of this study was to isolate and clone the Streptococcus pneumoniae surface protein (psp) gene in Escherichia coli *DH5 α* in order to provide a vaccine for children.

Methods: Sampling of a total of 60 pneumococcal isolates was isolated from nasopharyngeal samples of healthy children under 6 years of age. In order to isolate and initially identify Streptococcus pneumoniae, culture medium and biochemical tests were used and DNA extraction was performed. Then, strains with pspC gene were identified by PCR. The pspC gene of the positive strains was transfected into Escherichia coli host bacteria by vector and cloned by TA cloning technique. Finally, the expression of genes in Escherichia coli *DH5 α* was measured by Real time PCR technique. ClustalX and Mega5 software were used to draw the phylogenetic tree.

Results: A total of 12 pneumococcal isolates were isolated from the screening of clinical specimens sent to the laboratory, which were identified based on morphological, microscopic and biochemical characteristics. Of these, 1 isolate had pspC gene. After cloning, pspC genes were isolated from cloned selection colonies (blue / white). In order to confirm the results of DNA cloning, it was extracted from suspected colonies and PCR by real time test. Finally, sequencing images, m13 and proliferation curves, and confirmed gene expression in Escherichia coli *DH5 α* .

Conclusion: In this study, by genomic evaluation of pneumococci isolated from children under 6 years of age, pspC gene with immunization potential was extracted from this bacterium in order to make a vaccine. And cloning was successful. Finally, by examining the phylogenetic tree drawn in this study, the degree of similarity and kinship of Streptococcus pneumoniae with other species was shown.

Keywords: Streptococcus pneumoniae, PspC, Clonin

***Corresponding Author:**
Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Tell: 09125454074
E-mail: Dr_kumarss_aminia@yahoo.com