AUMJ
Alborz University of Medical Sciences
نشریه دانشگاه علوم پزشکی البرز، زمستان ۱۴۰۰، سال ۱۱، شماره ۱، صفحه‌های ۷۳ - ۸۸
مقاله تحقیقی

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

هاجر باقری[1]، حمید آزادگان قمی[2]، کیومرث امینی[3*]

[1] کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران
[2] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی ،واحد اراک، اراک، ایران
[3] 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 ذات الریه می‌باشد.باکتری حامل ژن پروتئین سطحی Pneumococcal (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 *اشرشیاکلی* 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 ٦ 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 *اشرشیاکلی* الحاق و از طریق تکنیک TA کلونینگ کلون شدند و در پایان از طریق تکنیک Real time PCR میزان بیان ژن‌ها در *اشرشیا کلی* DH5 آلفا سنجیده و برای رسم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار clustalX و Mega5 استفاده شد.

یافته ها: 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 ٦ 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_amini@yahoo.com

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]

مقدمه

استرپتوکوک (استرپتوکوکوس) نومونیا یا پنوموکوک، دیپلوکوک گرم مثبت به قطر ۰/۵ تا ۱/۲ میکرومتر، آلفا همولیتیک و تحمل‌کننده اکسیژن از جنس استرپتوکوکوس است. [۱] پنوموکوک یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری زا در انسان است. این باکتری عامل اصلی بیماری پنومونی (سینه پهلو)است. استرپتوکوک‌ها یک کپسول پلی ساکاریدی دارند که تعیین نوع آنها را با آنتی‌بادی های اختصاصی سرمی امکان‌پذیر می‌سازد [۲]. استرپتوکوک پنومونیه همچنین عامل اصلی ذات‌الریه، منتژیت، سینوزیت، اوتیت (عفونت گوش میانی)، باکتریمی، سپسیس، منتژیت، استئومیلیت، آرتریت سپتیک، اندوکاردیت، پریتونیت، پریکاردیت، سلولیت و آبسه‌های مغزی است که هر ساله هزاران کودک را در سراسر جهان می‌کشد. از E.coli DH5αبرای کلونینگ و بیان بسیاری از ژن ها، تولید محصولات، تولید واکسن و زیست پالایی نیز استفاده شده است [۳].

مطالعات متعدد نشان می‌دهد که PspC هدفی بسیار امیدوارکننده برای فرمولاسیون های واکسن جدید است. واکسن‌های نسل اول پنوموکوک در برگیرنده ۲۳ سروتیپ رایج آنتی ژن های کپسولی این باکتری هستند. این واکسن‌ها در ٦٠ ٪موارد پاسخ ایمنی محافظتی در بالغین ایجاد می‌کند و در کودکان بدلیل عدم بلوغ سیستم ایمنی محافظت قابل قبولی به وجود نمی‌آورد نسل دوم واکسن های پنوموک شامل انواع کونژوگه هستند که در آن آنتی ژن های کپسولی (۷سروتیپ مختلف) با بخشی از اگزوتوکسین دیفتری کونژوگه شده است. این گروه از واکسن‌ها حفاظت قابل توجهی را در کودکان ایجاد می‌کنند. واکسن‌های کپسولی تنها باعث ایجاد مصونیت در برابر سروتیپ‌های موجود در واکسن می‌شوند [۳].

یکی از فاکتورهای اصلی بیماری زایی پنوموکوک, علاوه بر کپسول پلی–ساکاریدی, آنتی ژن PspC Pneumococcal surface)) protein C)) می‌باشد که در سطح تمامی سویه‌های 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 می‌باشد و می‌تواند کاندید مناسبی برای تولید واکسن موثر در برابر سویه های پنوموکوکی باشد [٤].

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 واکسن‌ها وابسته به سروتیپ هستند و حفاظت کامل در برابر عفونت های پنوموکوکی را به وجود نمی آورند [٥]، جایگزینی سروتایپ های پنوموکوک در جمعیت واکسینه شده نیاز به واکسن‌های جدید با پوشش وسیع را نشان داده و تحقیقات را برای واکسن‌های مبتنی بر پروتئین انجام داده است. پروتئین سطحی A Pneumococcal (PspC)از S محافظت می‌کند. استرپتوکوکوس پنومونیه از اثر باکتریسیدال انسانی جلوگیری می‌کند و مانع از تشکیل لایه مکمل می‌گردد [٦].

امروزه شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه در مناطقی که واکسیناسیون پنوموکوک انجام شده است عفونت‌های ناشی از سروتیپ‌های غیر واکسن شیوع بیشتری پیدا کردند [٤]، لذا تلاش‌های زیادی برای توسعه واکسن‌های مستقل از سروتیپ و بر پایه پروتئین صورت می‌گیرد. پروتئین‌های سطحی نامزد مناسبی برای ساخت این نوع واکسن‌ها محسوب می‌شوند. تا به حال تعداد زیادی از این نوع پروتئین‌ها در پنوموکوک شناسایی شده‌اند که در پروسه استقرار باکتری بکار گرفته می‌شوند. همسانه سازی، کلون‌سازی 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 می‌دهد [۸]، لذا هدف از این پژوهش جداسازی و کلونینگ ژن پروتئین سطحی استرپتوکوک پنومونیه (psp) در باکتری اشرشیاکلی DH5α آلفا به منظور تهیه واکسن در کودکان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه تحقیق حاضر، مطالعه پژوهشی می‌باشد. نمونه‌ها از

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]

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 ٦ سال جداسازی شد و به منظور جداسازی و شناسایی اولیه میکروارگانیسم‌ها از محیط کشت و آزمون های بیوشیمیایی استفاده شد [۹].

نمونه برداری با استفاده از یک سواپ استریل نمونه بلافاصله به محیط کشت اولیه یا محیط کشت پایه انتقال داده شد. نمونه‌ها 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 می‌باشد و باعث از بین رفتن سریع باکتری‌ها می‌شود.

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 تا٤٨ 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 جدایه‌های استرپتوکوکی 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].

نمونه‌ها روی محیط بلاد آگار(شرکت های مدیا – محصول کشور هندوستان) و محیط‌های حاوی صفرا کشت داده شدند. بعد از ٢٤ ساعت انکوباسیون در جار شمع‌دار و در ۳۷ درجه سانتیگراد، کلنی‌های گرد، شفاف و کوچک با یک هاله نازک همولیز آلفا پدیدار شد. بعد از ٤٨ ساعت به‌واسطه خاصیت اتولیز، مرکز کلنی مقعر شد. بعضی از سوش‌های پنوموکک ایجاد کلنی‌های مخاطی بزرگ نموده که در سطح آگار شبیه قطره روغن به نظر می‌رسند.

سویه استاندارد مورد مصرف در این تحقیق

استرپتوکوکوس آلفا همولیتیک با شماره ١٤٤٧ PTCC (٨٦٦٨ 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 پلیمراز 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 هرکدام یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ٤ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) و ٤ 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 ٥٦ درجه سانتی گراد برای ژنpspC در دمای ٦۰ 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).

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]

جدول۱: پرایمر های مورد استفاده [۹] در این پژوهش

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

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

مرحله	دما(درجه سیلسیوس)	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 می‌شود. قطعات DNA حاصل از استخراج یکسان نبوده و دارای طول های متفاوتی می‌باشند که اندازه قطعات ماده ژنتیکی اهمیت دارد و جهت جداسازی آن‌ها از دستگاه الکتروفورز استفاده شد. مواد با مولکول‌ها براساس بارالکتریکی خود به سمت قطب های مخالف حرکت می‌کنند. DNA به علت داشتن گروه‌های فسفات در اسکلت خود دارای بار منفی است. این بار منفی سبب می‌شود 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؛ به‌طول قطعات (و در نتیجه جرم آن‌ها) بستگی دارد زیرا با توجه به این که بار آن‌ها یکسان است، حرکت آن‌ها در ژل بر اساس وزن مولکولی آن‌ها بوده و بر همین اساس جدا می‌شوند. در کنار نمونه‌ها در ژل، همواره یک نمونه مارکر که حاوی قطعات DNA با وزن مولکولی مشخص است قرار می‌دهند که با توجه به آن می‌توان وزن قطعات نمونه مجهول را تشخیص داد.

کلون کردن ژن pspC در باکتری اشریشیاکلی اوریگامیگ

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 می‌باشد. 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 می‌آید، 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 می‌نماید. DNA پلی مرازهای مقاوم به حرارت همانند DNA Taq منجر می‌شوند که محصولات PCR در انتهای ´۳ خود یک باقیمانده آدنین تنها را دارا باشند.

واکنش بوسیله DNA لیگاز همانند واکنش های لیگاسیون رایج کاتالیز می‌شود. همچنین امکان انجام کلونینگ انتهاهای چسبنده با محصولات PCR وجود دارد. در این حالت پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی که حاوی یک جایگاه اندونوکلئاز تحدیدی در داخل خود می‌باشند، طراحی می‌شوند. با توجه به اینکه مکمل بودن پرایمرها ضرورتا باید در انتهای ´۳ آن‌ها باشد و در نتیجه انتهای ´۵

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]

پرایمر ناحیه ای است که جایگاه آنزیم تحدیدی قرار داده می‌شود.این عمل با توجه به اینکه کارایی هضم با اندونوکلئاز تحدیدی معین را در صورتی که نوکلئوتید های اضافی در انتهای ´۵ کم باشد، کاهش می‌یابد نیازمند طراحی دقیق می‌باشد و در صورت طراحی دقیق پرایمر در این حالت واکنش های هضم و لیگاسیون مشابه با واکنش های متداول انجام می‌گیرد. 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 می‌باشد، چون MCS وسط Lac z قرار گرفته است اگر قطعه ای وارد وکتور شود ژن Lac z تخریب می‌شود. 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 می‌شود. 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 می‌شود. 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 می‌باشد، کلنی هایی که می‌توانند در محیط رشد کنند در حقیقت نشان دهنده دریافت پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین است.

تعیین میزان بیان ژن pspC با روش Real time PCR

قبل از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز باکتری نوترکیب انکوبه گذاری می‌شود. 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 مقاومت به ژن pspC بودند) که در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند (در OD600= ۰,٦-۰,٤) مورد استفاده قرار گرفت [۱۳].

انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز Real-Time-PCR

واکنش زنجیره ای پلیمراز 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 میکرولیتر از Depc water، 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 دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد برای مدت ٤۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ٦۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی ١٦ sr RNA 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 [۱۳،۱٤].

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 شدهٔ مستقیم و معکوس توسط نرم افزار DNA Baser رشتهٔ 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 n Blast در بانک ژن جستجو شد و توالی های حاصل از Blastتوسط نرم افزار W Clustal هم ردیف شدند [۱۵]، آنالیز فیلوژنتیکی پس از همردیف نمودن توالی‌ها توسط نرم افزار W Clustal،با استفاده از برنامه های۱۰/۵ MEGA درخت های فیلوژنتیکی ترسیم شدند. درخت های تهیه شده با استفاده از روش الحاق ترسیم MEGA 5.10 برنامه در Neighbor Joining همسایه

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]

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 افزارExcel ، نمودار مربوطه رسم شد .

یافته ها

در مجموع از ۱۰۰ نمونه تحت بررسی ۱۲ نمونه استرپتوکوکوس پنومونیه شناسایی شد پس از انجام تست های تشخیصی تفریقی، جداسازی و شناسایی شد. کوکسی های گرم مثبت استرپتوکوکوس پنومونیه 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 پنومونیه منفی بوده و تست همولیز به صورت هاله روشن اطراف کلنی باکتری به- صورت همولیز آلفا مشخص شد. بعد از شناسایی سویه پنومونیه 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 در خصوص تعیین هویت جدایه‌ها به شرح ذیل می‌باشد. نتایج در جدول ۳ آورده شد.

نتایج استخراج DNA

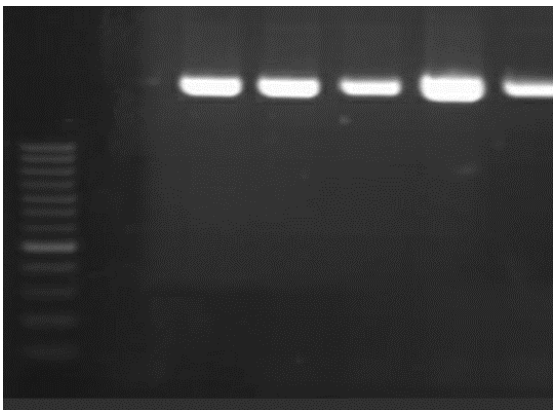
پس از استخراج DNA غلظت DNA در نمونه های استخراج شده با استفاده از روش فلورومتر بررسی شد و استخراج آن مورد تایید قرار گرفت. شکل (۱)

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 می‌دهد. در این تصاویر می‌توان 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.

جدول ۳: نتایج تستهای بیوشیمیایی استرپتوکوک پنومونیه

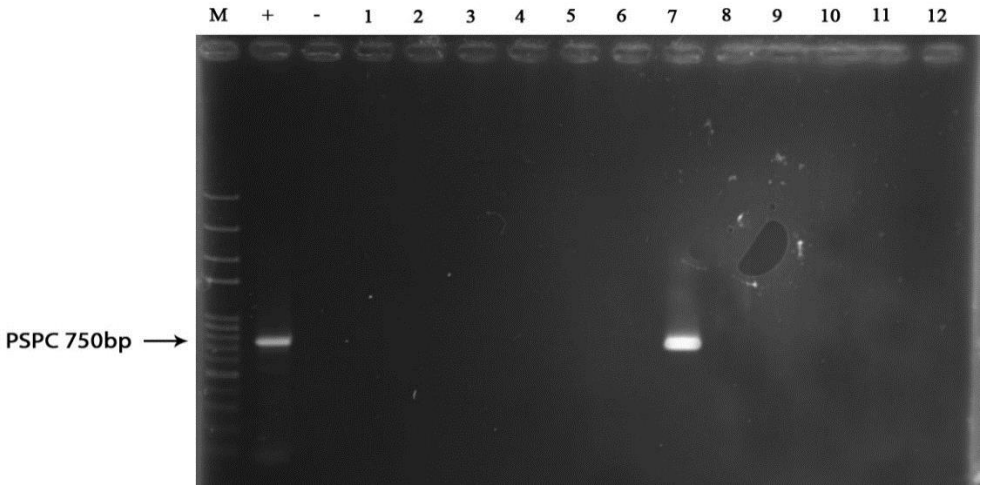
تست بیوشیمیایی		تست بیوشیمیایی		تست بیوشیمیایی	
تست اندول	-	تست سیترات	+	هیدرولیز ژلاتین	+
متیل رد	+	تست دی ان آز	+	لاکتوز	+
تست اوره آز	-	تست احیای نیترات	-	سوربیتول	-



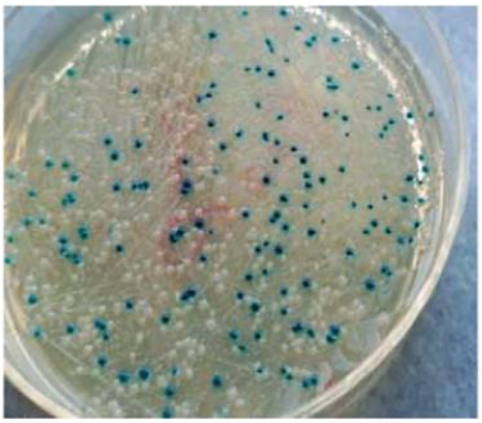
شکل۱ : نتیجه تست تایید استخراج DNA

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]



شکل۲ : نتیجه PCR ژن های pspC



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

همانطور که در مارکر تصاویر حاصل از PCR مشاهده می‌شود باند ۷۵۰ bp که نشان دهنده ژن pspC می‌باشد و از ۱۲ سویه استرپتوکوکوس پنومونیه جدا شده، ۱ (۸/۳ ٪) سویه واجد ژن pspC بود. (جدول۳)

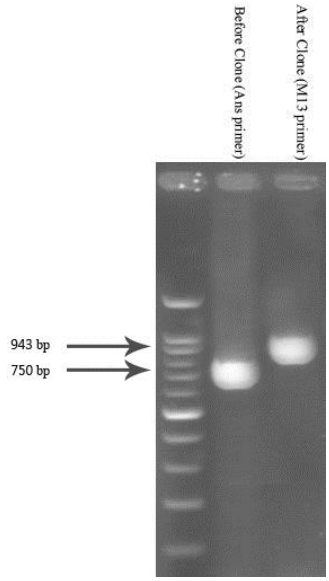
نتایج حاصل از کلونینگ ژنpspC

پس از کلون کردن ژن های pspC توسط کلنی سلکشن (آبی/سفید) سویه های کلون شده جداسازی شدند (شکل۳).

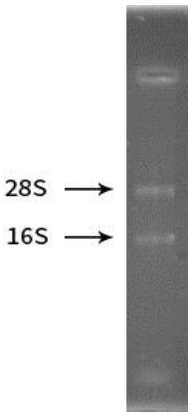
تایید نتایج کلون بوسیله PCR و سکانس

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 هایpspC به باکتری اشریشیاکلی DH5 α تایید شد که در شکل های (٤) قابل رویت است.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]



شکل٤: تایید کلونینگ توسط PCR با پرایمر های M13 وکتور و سکانس آن



شکل ٥ : 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

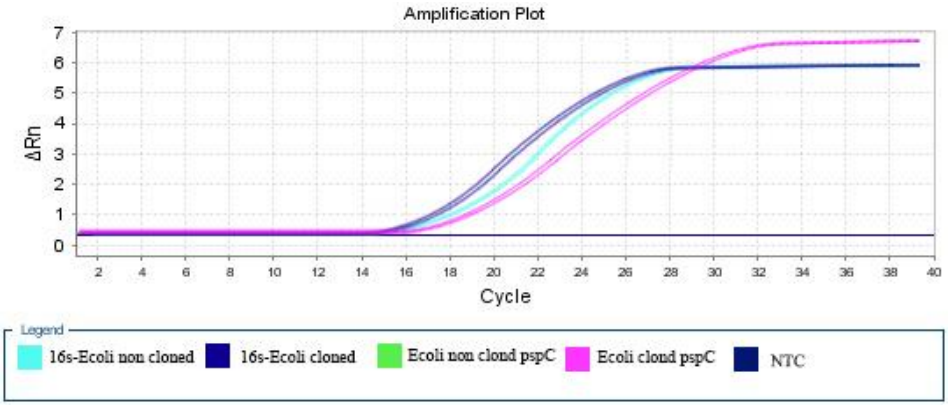
به منظور تایید نتایج کلونینگ، RNA کلنی های مشکوک استخراج شده و cDNA ساخته شد، نتیجه تایید استخراج RNA در شکل (۵) قابل مشاهده است.

نتایج بررسی بیانpspC کلون شده بوسیله Real time PCR

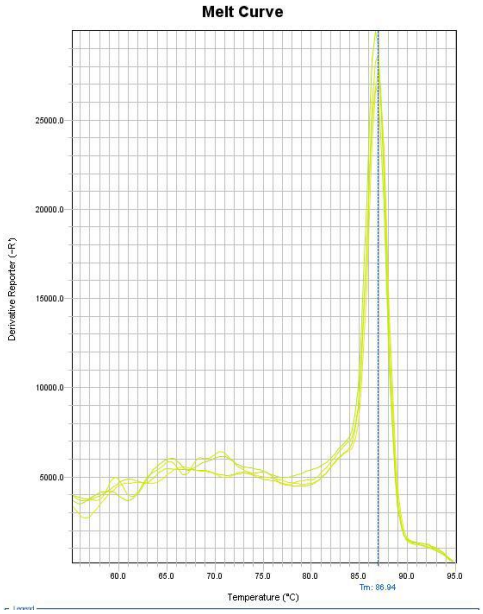
به منظور تایید نتایج کلونینگ RNA کلنی های مشکوک استخراج شده و cDNA ساخته شد و توسط آزمون Real time PCR میزان بیان ژن pspC بررسی شد .

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]



شکل ٦: نتایج منحنی تکثیر Real Time PCR



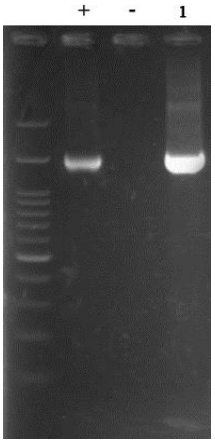
شکل ۷: نتایج منحنی ذوب Real time PCR

تعیین هویت مولکولی جنس استرپتوکوکوس

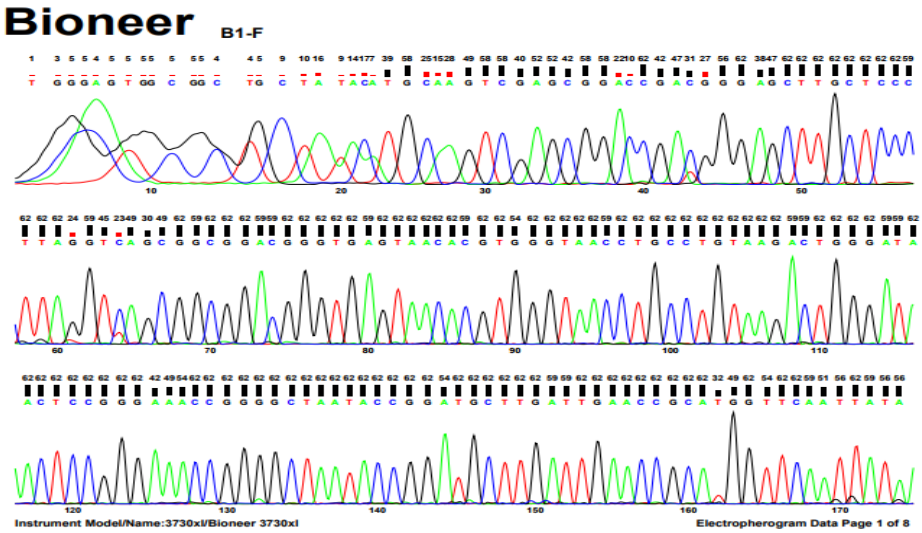
به منظور تعیین هویت مولکولی جنس استرپتوکوکوس از پرایمرهای عمومی 16s استفاده گردید (نتیجه PCR در شکل٤-٥) و در نهایت محصول PCR برای سکانس به شرکت Bioneer ارسال گردید و BLAST شد(نتیجه سکانس و بلاست در شکل٦)

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]



شکل۸ : نتیجه آزمون PCR با پرایمرهای عمومی 16s به منظور تعیین هویت مولکولی جنس استرپتوکوکوس



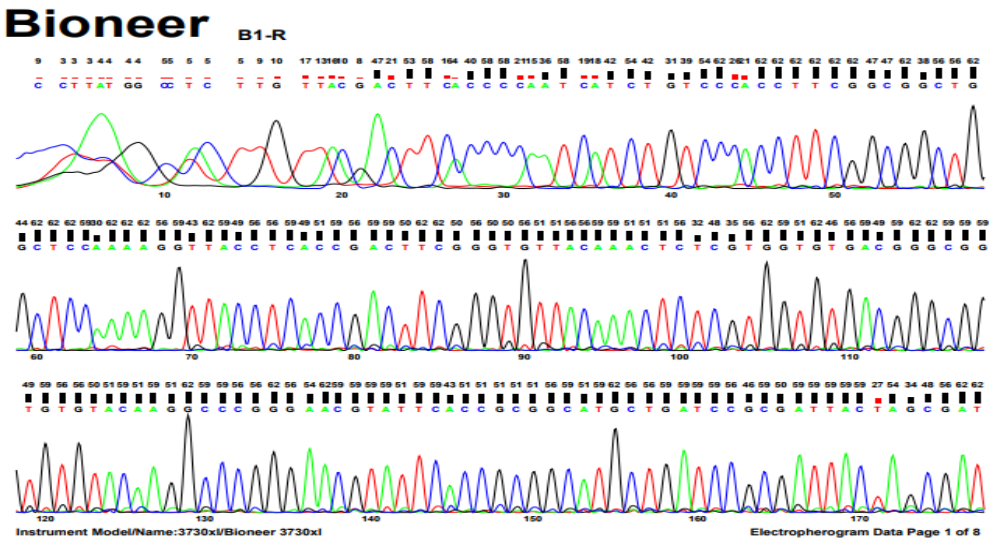
شکل۹: نتیجه سکانسیگ و بلاستpspC Forward

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 طورجداگانه 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 اشریشیاکلی DH5α تایید شد(شکل۹و۱۰).

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]



شکل ۱۰ : نتیجه سکانسیگ و بلاست pspC Revers

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 ۱۶ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج درخت فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) نشان می‌دهد که سایر گونه های استرپتوکوکی با گونه پنومونیه با در یک کلاد (خوشه) قرار گرفتند که بیانگر رابطه خویشاوندی نزدیک آن‌ها با هم بود (شکل ۱۰و۹).

بحث

پنوموکوک یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری زا در انسان است. این باکتری عامل اصلی بیماری پنومونی (سینه پهلو) استرپتوکوک‌ها یک کپسول پلی ساکاریدی دارند که تعیین نوع را با آنتی‌بادهای اختصاصی سرمی امکان‌پذیر می‌سازد. استرپتوکوک پنومونیه همچنین عامل اصلی ذات‌الریه، مننژیت، سینوزیت، اوتیت (عفونت گوش میانی)، باکتریمی، سپسیس، مننژیت، استئومیلیت، آرتریت سپتیک، اندوکاردیت، پریتونیت، پریکاردیت، سلولیت و آبسه‌های مغزی است که هر ساله هزاران کودک را در سراسر جهان می‌کشد [۱۶]، یکی از فاکتورهای اصلی بیماری زایی پنوموکوک, علاوه بر کپسول پلی–ساکاریدی, آنتی ژن PspC Pneumococcal (surface protein C)) می‌باشد که در سطح تمامی سویه‌های 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 می‌باشد و می‌تواند کاندید مناسبی برای تولید واکسن موثر در برابر سویه های پنوموکوکی 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 محدودالاثر ویژه بریده شد و پس از اتصال و تبدیل از حالت خطی به حلقوی، در

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]
[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]

نهایت با روش ترانسفورماسیون بیوشیمیایی ماده کلریدکلسیم 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 پنوموکوکی استفاده گردید. همچنین بررسی قابلیت این آنتی بادی‌ها در اتصال به سطح سویه های پنوموکوکی متعلق هر دو خانواده PspA نیز بوسیله ی تست الایزا سنجیده شد [۱۸].

در مطالعه پرویزی و همکاران، در مجموع ٤٣ ایزوله استرپتوکوکوس پنومونیه از نمونه های نازوفارنژیال کودکان سالمی که در سال ۱۳۹۲ به مهدکودک های شهرستان اردبیل مراجعه کرده بودند، جدا شد. ایزوله‌ها در ابتدا توسط آزمایشات فنوتیپی مانند حساسیت به اپتوچین 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، rrgA و lytA از روش PCR استفاده شد. در ٨٤/٤ درصد ایزوله‌ها حداقل یکی از ژن های مورد مطالعه ردیابی شد. ژن های lytA، pspC، phtE، phtD و rrgA به ترتیب در ۷۰، ٦۰، ۳۹/۵، ۳۵ و ۲۵/۵ ٪ ایزوله‌ها شناسایی شدند [۹]، نتایج این مطالعه نشان داد که ژن های مورد مطالعه به طور یکنواخت در میان ایزوله‌ها وجود ندارند و برای بدست آوردن یک واکسن پنوموکوکی با پوشش حفاظتی کامل بایستی از مجموعه ای از این آنتی ژن‌ها استفاده شود که با تحقیق حاضر در یک راستا است.

غلامحسینی مقدم و همکاران تعداد ۲٦۰ سواپ از ناحیه نازوفارنکس کودکان ۱ ماهه تا ٦ ساله در ٤ گروه سنی در شهرستان مشهد جمع آوری گردید. دراین 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 وpspC در جدایه‌ها استفاده شد. سروتایپینگ جدایه‌ها با استفاده از روش Multiplex PCR انجام گردید. نتایج نشان داد که ۵۹ جدایه به عنوان استرپتوکوک پنومونه تایید شد. درمیان این جدایه‌ها استرپتوکوک پنومونیه ۵۰جدایه (٨٤/٧٤ ٪)، ۱۹ جدایه (۳۲/۲۰ ٪) و ۲ جدایه(۳/۳۸ ٪) به ترتیب واجد ژن های lytA, rrgA و pspC بودند. تفاوت آشکاری در بین ٤ گروه سنی کودکان براساس جنس در کلونیزه شدن استرپتوکوک پنومونیه وجود نداشت. سروتیپ ٦ A/B دارای بیشترین فراوانی در بین گروه های سنی بود. بیشترین جدایه‌ها در گروه سنی۷۲-۵٤ ماهه وجود داشتند. این مطالعه نشان دهنده میزان بالای ناقلین پنوموکوک در ناحیه نازوفارنکس کودکان با سن ۵٤-۷۲ ماهه در مشهد می‌باشد [۱۹]، بنابراین مطالعات اپیدمیولوژیکی می‌تواند، 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 جدایه‌های Streptococcus pneumonia جمع آوری شده از ٤ مرکز مراقبت اصلی و مرکز پزشکی کودکان در تهران مورد ارزیابی قرار گرفتند، تعداد ۳۰۰ نمونه سواب نازوفارنکس از کودکان زیر ٦ 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 سواب بینسفارنژال، ۱۰۲ جدایه استرپتوکوک پنومونیه با استفاده از آزمایشات تایید شدند. از بین این جدا شده‌ها، ۸۷ (۸۵/۲ ٪)، ٥٤ (۵۲/۹ ٪)، ۵۱ (۵۰ ٪)، ٤۳ (٤۲/۱ ٪) و ۳۱ (۳۰/۳ ٪) از نظر ژن هایlytA، rrgA، phtE، pspC و phtD مثبت بودند [٤]، این مطالعه که pspC یکی از مهم ترین گونه های پنومونیه و از مهم ترین نشانگرهای ژنتیک برای اهداف تشخیصی است. این یافته‌ها می‌تواند 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 پنوموکوکی مرتبط با دیواره سلولی در باکتری استرپتوکوکوس پنومونیه و آنتی ژن پروتئینی سطحی(pspA) پرداخته شد. با استفاده از تنوع آللی pspA مشاهده شده در یک مجموعه بزرگ پنوموکوکی، حضور و فراوانی ژن های psp بررسی شد و تنوع آنتی ژنی آن‌ها پایش شد. در این بررسی

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]

طیف عملکرد بیولوژیکی را در بین انواع متنوع pspA مشخص گردید و نشان داده شد که تنوع توالی pspA نشان دهنده تفاوت های عملکردی بوده و از این تنوع توالی در pspA می‌توان برای ساخت و تهیه واکسن به منظور تقویت سیستم ایمنی استفاده گردد [۵]، 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 بادی های مونوکلونال در برابر پروتئین سطح پنوموکوکی (PspA) نشان داده شد که موش‌ها را از عفونت کشنده پنوموکوکی محافظت می‌کند. PspA از نظر سرولوژیکی بسیار متغیر است و این احتمال وجود دارد که PspA از یک سویه نتواند پاسخ های محافظتی را در برابر سویه هایی دیگری که دارای PspA سرولوژیکی متفاوت هستند ایجاد کند. این یافته نشان داد که PspA می‌تواند در صورت عدم وجود سایر آنتی ژن های پنوموکوکی پاسخ ایمنی ارائه کند. ایمنی ایجاد شده احتمالاً به واسطه آنتی بادی تولید شده است زیرا می‌تواند به صورت واکسن ارائه شود [۲۰]، تولید دیگر پروتئین های پنوموکوکی (غیر از PspA) نتوانست محافظت در برابر عفونت کشنده پنوموکوکی 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 عفونت های دستگاه تنفسی فوقانی بودند به دست آمد، در بین ۲۵۱ پنوموکوکی مورد مطالعه، اکثریت (٤٩/٤ ٪) دارای ژن PspA 2 بودند، از نظر سن، جنس بیمار، منبع جدایه‌ها یا حساسیت جدایه‌ها به پنی سیلین .G، فراوانی حضور ژن mefA و سروتیپ های B۱۵ و F ۱۹ از نظر آماری نسبت به ژن PspA2 شایع تر بود .اکثریت قریب به اتفاق پنوموکوکی 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 بیماری های عفونی پنوموکوکی ایجاد کند، زیرا در مقابل اکثر پنوموکوک هایی 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 درآمریکا نیز نشان داده شده که در ۱۰۷ سویه پنوموکوک مورد مطالعه ۱۰۰ ٪ سویه‌ها دارای ژن phtD و ۹۷ ٪سویه‌ها حاوی ژن phtE بودند. ٥٤ ٪از سویه‌ها هر ٤ ژن خانواده pht داشتند. در بخش دیگر این مطالعه فراوانی ژن rrgAدر ایزوله های پنوموکوک مورد مطالعه قرار گرفت. این ژن کد کننده زیرواحد RrgAپیلی پنوموکوک می‌باشد. پیلی در پنوموکوک از سه زیر واحد رشته ای (RrgB، RrgA وRrgC) تشکیل شده است. از میان آن‌ها زیر واحد RrgA نقش مهمتری در اتصال باکتری به سلول های اپیتلیال دارد بطوری که موتانت هایی که قادر به تولید آن نیستند ازقدرت عفونت زایی کمتری در مقایسه با سویه های اجدادی برخوردارند .نتایج این مطالعه نشان داد که تنها ۲۵/۵ ٪ ایزوله‌ها حاوی ژن rrgA بودند. در مطالعه مشابه دیگری این ژن در ۲۷ ٪ ایزوله های 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 spea13 + 5، spec، speg، spej، spek و spel است. گروه دوم شامل spea14، speh، spei،spem، ssa و smez حضور ژن های 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، ۲٤]، پس از آزمایش بیش از ۳۰۰ نمونه بالینی جدایه ها، یک سویه بدون سوپرآنتی 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 انتروکوکی ترسیم گردید.

نتیجه گیری

استرپتوکوکوس پنومونیه از جمله باکتری های بیماری زا و عامل بیماری های تنفسی، ذات الریه، مننژیت در افراد جامعه بالاخص 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 وکلونینگ 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

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]

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 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.

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. Jedrzejas 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.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]

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.

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]

Hajar Bagheri [1], Hamid Azadegan Qomi[2], Kiomars 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 *DH5α* 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 *DH5α* 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 *D*H5α.
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_amini@yahoo.com

[Downloaded from aums.abzums.ac.ir on 2026-11-10]

[DOI: 10.29252/aums.11.1.73]