



Cloning and Expression of the *Spy* Gene of *Streptococcus pyogenes* in Origami Susceptible Cells as a Vaccine Candidate

Mobina Poortavakol ¹, Sasan Saki ², Behrooz Shojaei Saadi ², Rezvan Naemi ³

¹ MSc, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran. ² Assistant professor, Department of Medical Laboratory, Faculty of Medical sciences, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran.

³ MSc, Department of Microbiology, Faculty of Basic sciences, Shahid Rajaei Teacher Training University, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objectives: *Streptococcus pyogenes* (Group A , GAS) is responsible for a wide range of infections. Additionally, acute rheumatic fever and acute glomerulonephritis can occur following the Group A infections. Numerous studies have shown that the *Spy* gene is associated with increased immunogenicity and severe infections. The aim of this study was to clone and express the *Spy* gene of *Streptococcus pyogenes* in Origami susceptible cells to develop a potential vaccine for this infection in the future.

Materials and methods: In this descriptive cross-sectional study, 100 throat swabs were collected from patients visiting clinics in Tehran under sterile conditions. After transfer to the laboratory, strains isolation was performed using microbiological methods. Following DNA extraction and PCR testing to detect *Spy* gene, cloning was carried out in *Escherichia coli* Origami, the pET-26b plasmid. Colony selection, colony PCR, and Real-Time PCR were performed to confirm the accuracy of cloning.

Results: Out of 12 *Streptococcus pyogenes* strains, 11 isolates carried the *Spy* gene. Enzymatic digestion of the pET-26b plasmid and cloning into the *Escherichia coli* Origami expression vector were successful. Additionally, the Ct value of the cloned cells compared to the internal control without cloning indicated successful expression of the gene.

Conclusion: The results of this study indicate appropriate expression of the *Spy* gene using the cloning method in the *Escherichia coli* Origami vector and pET-26b plasmid, confirmed by Real-Time PCR.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, *Spy* gene, pET-26b plasmid, cloning.

Received: 4 June 2024

Revised: 1 July 2024

Accepted: 26 August 2024

Correspondence to: Sasan Saki

Tel: +98 9181606269

E-mail: sasansaki7478@gmail.com

Journal of Microbial World 2024, 17 (2): 95 - 106

DOI: <https://doi.org/10.82363/jmw.2024.1199729>



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



کلون سازی و بیان ژن *Spy*/استرپتوکوکوس پیوژنز در سلول های مستعد Origami به عنوان کاندید واکسن

مینا پورتوکل^۱، ساسان ساکی^{۲*}، بهروز شجاعی سعدی^۲، رضوان ناعمی^۳

^۱ کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی اراک، اراک، ایران. ^۲ استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی اراک، اراک، ایران. ^۳ کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی تهران، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: استرپتوکوکوس پیوژنز (گروه A، GAS) عامل طیف وسیعی از عفونت ها می باشد. همچنین، تب حاد روماتیسمی و گلو مریولونفریت حاد نیز به دنبال عفونت های گروه A استرپتوکوک ها بروز می کنند. مطالعات متعددی نشان داده اند که بیان ژن *Spy* مربوط به استرپتوکوکوس پیوژنز در بروز ایمنوژنیسیته و عفونت های وخیم افزایش دارد. هدف از مطالعه حاضر کلونینگ و بیان ژن *Spy* در سلول مستعد Origami به منظور تهیه واکسنی برای این عفونت در آینده بوده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۱۰۰ سواب حلق از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه های شهر تهران در شرایط استریل جمع آوری به آزمایشگاه منتقل شد. جداسازی سویه ها با روش های میکروبیولوژی انجام شد. پس از استخراج DNA و انجام آزمون PCR به منظور ردیابی ژن *Spy*، کلونینگ در وکتور/شریشیا کلی اوریگامی و پلاسمید pET-26b انجام شد. کلونال سلکشن و PCR کلونی، آزمون Real-Time PCR به منظور بررسی صحت کلونینگ انجام گردید.

یافته ها: از مجموع ۱۲ سویه استرپتوکوکوس پیوژنز، ۱۱ جدایه حامل ژن *Spy* بودند. برش آنزیمی پلاسمید pET-26 b و کلونینگ در وکتور بیانی/شریشیا کلی اوریگامی موفقیت آمیز بود. همچنین Ct سلول کلون شده در مقایسه با کنترل داخلی فاقد کلون، نشان دهنده بیان موفقیت آمیز بیان مناسب ژن *Spy* می باشد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه بیان مناسب ژن *Spy* در روش کلونینگ در وکتور/شریشیا کلی اوریگامی و پلاسمید pET-26b بود و تایید این نتایج با روش Real-Time PCR را نشان می دهد.

کلمات کلیدی: استرپتوکوکوس پیوژنز، ژن *Spy*، پلاسمید pET-26b، کلونینگ.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۶/۵

ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۴/۱۱

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۳/۱۵

مقدمه

معرفی گردید. امروزه واکسیناسیون برای مقابله با بیماری های عفونی لازم و ضروری است (۱). واکسن ها میزان مرگ و میر ناشی از بیماری های عفونی را در سطح جهان کاهش داده اند. واکسن های با اجرام زنده که از قدرت بیماریزایی آن ها کاسته شده است، معمولاً با دوز واحد می توانند ایمنی مؤثر و طولانی

پس از واکسن های تخفیف حدت یافته و زیر واحدی، DNA واکسن به عنوان واکسن نسل سوم در زمینه واکسن شناسی

(*) آدرس برای مکاتبه: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی اراک، اراک، ایران.
تلفن: ۰۹۱۸۱۶۰۶۲۶۹
پست الکترونیک: sasansaki7478@gmail.com



طبیعی (سلول یا بافت زنده) تکثیر می‌نمایند. هدف از ژن کلونینگ فراهم کردن نسخه‌های متعدد از یک ژن منفرد است که در حوزه‌های مختلف تحقیقاتی مورد استفاده است. به علاوه دارای کاربردهای پزشکی از قبیل ژن درمانی و کاربردهای صنعتی نظیر تولید مقدار زیادی از یک پروتئین می‌باشد (۶).

استرپتوکوکوس‌ها، باکتری‌های بیضی یا کروی شکل هستند و به صورت دیپلوکوکوس یا زنجیره‌ای آرایش می‌یابند. سطح تقسیم در این باکتری‌ها همواره یکسان است و بنابراین، این نوع تقسیم موجب زنجیره‌ای شدن آن‌ها می‌شود. طول زنجیره ممکن است بسته به نوع گونه و شرایط رشد، از یک جفت تا زنجیره‌ای بیش از ۳۰ سلول متفاوت باشد (۷و۸). استرپتوکوکوس‌ها باکتری‌های گرم مثبت، فاقد اسپور و غیر متحرک هستند. کشت کهنه‌ای این باکتری‌ها گرم منفی است. یکی از ویژگی‌های این باکتری‌ها آن است که فاقد آنزیم کاتالاز هستند. اکثر آن‌ها، به دلیل اینکه حتی در حضور اکسیژن به صورت تخمیری رشد می‌کنند، باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری و مقاوم به هوا هستند. این باکتری‌ها با تخمیر قند، اسید لاکتیک تولید می‌کنند. به‌طور کلی، برای جداسازی استرپتوکوکوس‌ها، به دلیل احتیاجات غذایی پیچیده‌ی شان، محیط کشت غنی از خون مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷و۸).

استرپتوکوک‌های گروه A نیز چندین فرآورده خارج سلولی تولید می‌کنند؛ بسیاری از آن‌ها نقش واقعی یا نظری در حداث استرپتوکوک‌های گروه A دارند. آگزوتوکسین‌های پیروژنیک استرپتوکوک (*SPes*) (به‌ویژه *SPE A* و *SPE B*) مسئول بثورات مخملک و همچنین عوامل اصلی بیماری‌زایی در پاتوژن سندرم شوک سمی استرپتوکوکی هستند. سه نوع *SPE* از نظر ایمنی مشخص، B و C به خوبی توصیف و ژن‌هایی که آن‌ها را رمزگذاری می‌کنند شناسایی و مشخص شده‌اند. ژن‌های (*SPes A*، *speC*، *speA* و *speC*) روی یک باکتریوفاز لیزوژنیک استرپتوکوک کدگذاری می‌شوند، در حالی‌که ژن آگزوتوکسین نوع B (*speB*) کروموزومی است. ژن *speB* در همه استرپتوکوک‌های گروه A یافت می‌شود، در حالی که دو ژن دیگر ممکن است وجود داشته باشند یا نباشند. محصول ژن

نسبت به واکسن‌های کشته شده ایجاد کنند. این واکسن‌ها علاوه بر دستگاه ایمنی هومورال، دستگاه ایمنی سلولی را نیز تحریک می‌نمایند. این نوع واکسن‌ها پتانسیل آن را دارند که واکنش‌های مشابه شکل طبیعی بیماری به خصوص در افراد با نقص ایمنی را ایجاد کنند. برای اینکه با واکسن‌های کشته شده ایمنی کافی و به مدت طولانی به دست آید، بایستی این واکسن‌ها ابتدا در چند نوبت تزریق کردند و برای جلوگیری از کاهش سطح آنتی‌بادی و ادامه ایمنی اغلب لازم است که تزریق واکسن در آینده یادآوری شود (۱و۲).

مطالعات مختلف با استفاده از خواص منحصر به فرد هر پاتوژن برای طراحی موثرترین واکسن بر اساس ماهیت آن عامل در تلاش می‌باشند (۳). یکی از مهمترین روش‌های ساخت واکسن استفاده از ویروس زنده ولی ضعیف شده است. اصطلاح زنده و ضعیف شده در این جا به واکسنی اطلاق می‌شود که از ویروس ضعیف شده استفاده می‌کند. در واقع، ویروس آنقدر ضعیف است که نمی‌تواند باعث بروز بیماری شود. این نوع از واکسن بسیار موثر است زیرا بیشترین شباهت را با عفونت طبیعی دارد و واکنش ایمنی قوی ایجاد می‌کند (۴). واکسن غیرفعال حاوی ویروسی است که کشته شده و قادر به بروز بیماری نیست. با این که ویروس زنده نیست، سلول‌های سیستم ایمنی هنوز به ویروس مرده موجود در واکسن واکنش نشان می‌دهند و سلول حافظه تولید می‌کنند تا برای پاتوژن واقعی آماده باشند. مزیت این روش این است که کودکان دچار ضعف ایمنی می‌توانند این واکسن را دریافت کنند زیرا این روش حتی باعث بروز بیماری خفیف نمی‌شود. نقطه ضعف این روش این است که گاهی لازم است چند دوز از واکسن غیرفعال تزریق شود تا ایمنی و مصونیت بالا به دست آید (۵).

واکسن زیرواحد حاوی بخشی از یک میکروارگانیسم است و به جای استفاده از کل پاتوژن، قسمت‌های ایمنی‌زای آن مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش به طور عمومی مبتنی بر تکنولوژی کلونینگ می‌باشد. کلونینگ فرآیندی است که طی آن توالی مشخصی از ژنوم را جداسازی می‌کنند و با ادغام آن در یک DNA هدف، نسخه‌های یکسانی از ژنوم را در محیط

مورفولوژی کلنی، همولیز بتا روی بلاگ آگار حاوی خون گوسفند ۵٪، تست کاتالاز، رنگ آمیزی گرم و حساسیت به دیسک باسیتراسین انجام شد. سپس، ایزوله‌های تأیید شده در محیط کشت برین هارت انفوزیون براث (BHI) حاوی ۲۰٪ گلیسرول برای انجام آزمایشات بعدی در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری گردید (۱۵).

استخراج DNA از نمونه‌های باکتری با استفاده از کیت Simultaneous DNA and RNA (Sina Pure ONE extraction) (سیناژن، ایران) انجام گردید. علاوه بر این برای بررسی سطح بیان ژن مورد نظر از کلنی‌های کشت بعد از کلونینگ جهت استخراج RNA از کیت (Sina Pure ONE Simultaneous DNA and RNA extraction) (سیناژن، ایران) استفاده شد. مراحل استخراج بر اساس دستورالعمل شرکت تولید کننده انجام شد. کیفیت نمونه استخراج شده با استفاده از نانودراپ اسپکتروفتومتر و نسبت جذب نوری در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این سنتز cDNA از نمونه‌های RNA استخراج شده با استفاده از کیت سنتز cDNA سیناکلون (سیناکلون، ایران) و بر اساس دستورالعمل سازنده انجام گردید.

ج) واکنش زنجیره پلیمراز (PCR): واکنش PCR به‌منظور به‌دست آمدن الگوی کافی از ژن برای کلونینگ ژن *Spy* و همچنین به‌منظور کنترل نمونه‌ها یا از نظر اختصاصیت با ژن 16SrRNA برای سویه مورد نظر باکتری بررسی شد. در طی این واکنش از ماستر میکس تولید شده توسط شرکت یکتا تجهیز (تهران، ایران) استفاده شد. علاوه بر این چرخه دمایی برای ژن‌ها به صورت ۴۰ سیکل دمایی ۹۵ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه که با یک پیش‌واش ۹۵ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه آغاز و در آخر با یک مرحله طویل سازی نهایی در ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه خاتمه یافت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. نتیجه آزمون PCR با استفاده از الکتروفورزیس ژل آگاروز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفته است.

speB در واقع یک آنزیم سیستمین پروتئاز است که می‌تواند ایمونوگلوبولین انسانی، فیبرونکتین، ویترونکتین و سایر پروتئین‌های سلول میزبان را بشکند که منجر به تشکیل پروتئین‌های کوچک و بیولوژیکی فعال می‌شود (۹ و ۷).

پپتیدها، از جمله اینترلوکین-۱، هیستامین و کینین‌ها بیان سیستمین پروتئاز SPE B و سایر عوامل تعیین کننده شدت توسط سیستم اپرون CoverS تنظیم می‌شود که واسطه پاسخ استرس استریپتوکوک گروه A است و سرکوب و کاهش سرکوب ماژور را تنظیم می‌کند. ژن‌های حدت به دنبال کلونیزاسیون با استریپتوکوک‌های گروه A، جهش در ژن‌های CoverS باعث ایجاد دخیل در چندین فاکتور حدت، از جمله تولید کپسول و ترشح چندین فاکتور حدت، از جمله سرین پروتئاز *Spy* CEP می‌شود. همولوگ‌های *Spy* CEP در انواع استریپتوکوک‌های بیماری زا کشف شده است. /استریپتوکوکوس پیوژنز یک همولوگ *Spy* CEP، *Scp A* یا *C5a* پپتیداز را بیان می‌کند که ۳۵٪ هویت با *Spy* CEP دارد. این پروتئین با جدا کردن جزء کموتاکتیک آبشار کمپلمان *C5a* به فرار از سیستم ایمنی کمک می‌کند. این پروتئین به دلیل نقش آن در هر دو پاتوژنز و به‌عنوان یک نامزد بالقوه واکسن با جزئیات قابل توجهی مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۰-۱۲). بنابراین هدف از مطالعه حاضر کلونینگ و بیان ژن *SPY*-ستریپتوکوکوس پیوژنز در سلول مستعد اوریگامی به منظور تهیه واکسنی برای این عفونت در آینده بوده است.

مواد و روش‌ها

الف) بیماران و نمونه‌گیری: در طی این مطالعه توصیفی-مقطعی نمونه‌گیری به صورت غیر تصادفی از بیماران مراجعه مراجعه کننده به درمانگاه مرکز طبی اطفال شهر تهران با استفاده از سواب‌های استریل تهیه گردید. پس از شرح مراحل تحقیق، از تمامی بیماران رضایتنامه کتبی اخذ گردید.

نمونه‌ها از ناحیه حلق بیماران با استفاده از سواب استریل جمع‌آوری و سپس در بافر فسفات با pH برابر ۷ به آزمایشگاه انتقال داده شدند. شناسایی کلنی‌های رشد یافته با استفاده از

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده.

نام ژن	توالی پرایمر	سایز باند
16Sr RNA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG AAG GAG GTG GAT CCA GCC GCA	190
<i>Spy</i>	AAAGACCGCCTTAACCACCT TGG CAA GGT AAA CTT CTA AAG CA	407
T7 Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG GCTAGTTATTGCTCAGCGG	-

پرایمر الیگونوکلئوتیدی اساسی ترین عامل موثر بر راندمان و اختصاصی شدن واکنش PCR می باشد. طراحی دقیق پرایمر برای به دست آوردن محصولات مورد نظر در مقادیر مطلوب و جلوگیری از تکثیر توالی های غیر اختصاصی ضروری است. معمولاً 1 M - ۰/۱ پرایمر در هر واکنش مورد نیاز می باشد. برای شناسایی محصولات PCR از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد.

د) کلونینگ ژن *spy* کلونینگ با استفاده از pET-26b حاوی ژن *Spy* و هضم آنزیمی انجام شد. همچنین بررسی پلاسمید قبل از القا به باکتری با استفاده از الکتروفورز و استخراج از ژل انجام شد. انتقال وکتور با شوک حرارتی در محیط DH5a انجام گردید. برای اطمینان از رشد باکتری های دارای وکتور حاوی *spy* آمپی سیلین به محیط اضافه گردید. در مرحله بعدی، برای تایید صحت همسانه سازی کلنی های رشد کرده بر روی محیط انتخابی LB + Kana، با استفاده از پرایمرهای T7F و T7R (پرایمرهای مناسب برای پروموتور) T7 واکنش Colony PCR انجام شد (۱۳و۱۴).

ه) بررسی کلونینگ با روش *Real-Time-PCR*. بررسی صحت کلونینگ با دو روش *Real-Time-PCR* و توالی یابی ارزیابی گردید. پرایمرهای جدول ۱ و توالی یابی مستقیم با روش سنگر برای توالی یابی استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از مستر میکس (Prime Q-MasterMix Genet bio, South Korea) انجام گردید. واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر از مستر میکس، ۵ میکرولیتر از Depc water، یک میکرولیتر از پرایمر فوروارد، یک میکرولیتر از پرایمر ریورس، یک میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر cDNA بود. تکثیر قطعه های مورد نظر در دستگاه Corbett با برنامه دناتوراسیون

اولیه ۹۵ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سلسیوس برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی 16Sr RNA عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. سپس برای محاسبه میزان بیان ژنی *spy* و رسم نمودارهای مربوطه از نرم افزار PRISM و مقدار بیان ژن هدف محاسبه شد. آنالیز میزان بیان با اندازه گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با مجموعه ای از سوره ها و سروتیپ های استرپتوکوک انجام شد. بررسی سطح بیان با استفاده از روش CTΔΔ-۲ انجام شد.

یافته ها

الف) نتایج غربالگری نمونه های بالینی: در نتیجه غربالگری ۱۰۰ سوال حلق جمع آوری شده از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه درمانگاه مرکز طبی اطفال شهر تهران، در مجموع ۱۲ سویه مشکوک به گروه A استرپتوکوک (استرپتوکوکس پیوژنز) جداسازی گردید. لازم به ذکر است سن کودکان از ۶ سال تا ۱۵ سال بود با میانگین سنی ۹±۳/۱ سال و ۶۳ سواب از پسر بچه ها و مابقی از دختران مراجعه کننده به درمانگاه اخذ گردید. ب) بررسی فراوانی ژن *spy* و کلونینگ این ژن: واکنش PCR برای ژن تحت مطالعه با پرایمرهای ذکر شده انجام شد. نتایج واکنش PCR نشان داد که ۱۱ سویه (۹۱/۷٪) حامل ژن *spy* بودند (شکل ۱).

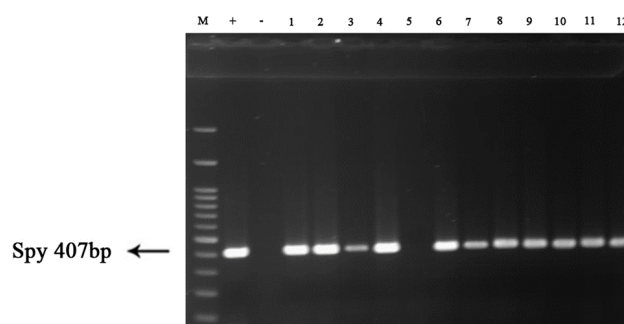
کلونینگ ژن *spy* با روش کلونال سلکشن و PCR کلنی: پس از کلون کردن سویه حامل ژن *spy* توسط کلنی سلکشن (آبی/سفید) سویه های کلون شده جداسازی شدند (شکل ۲). به منظور تایید نتایج کلون، DNA از کلنی های مشکوک استخراج شده و توسط آزمون PCR و در نهایت با سکانس محصول PCR، ورود ژن های *spy* به باکتری اشریشیاکلی اوریگامی تایید شد که در شکل ۲ قابل رویت است.

پس از کلون کردن سویه حامل ژن *spy* توسط کلنی سلکشن (آبی/سفید) سویه های کلون شده جداسازی شدند. به منظور تایید نتایج کلون، DNA از کلنی های مشکوک استخراج شده و

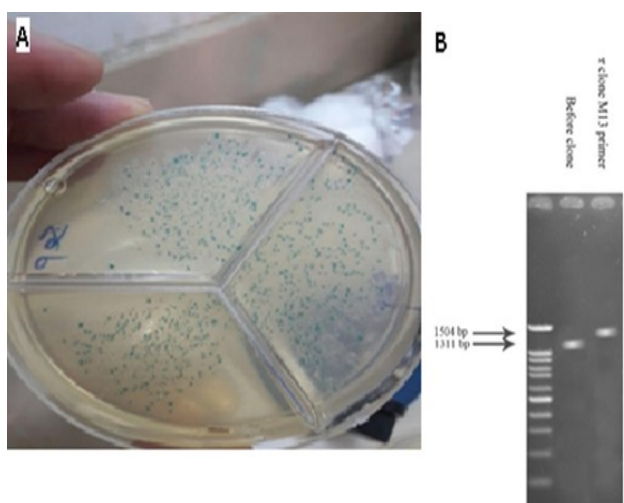
آماري بسيار معنی دار بود. همچنین تیمار پس از ۴ ساعت در غلظت ۰/۱ میلی‌لیتر از IPTG نشان داد که میانگین Fold change سویه‌های تحت تیمار در مقایسه با سویه‌های تیمار برابر ۰/۳۴ بود. این نتایج از نظر آماری بسیار معنی‌دار بود (۰/۰۰۳) (شکل ۳و۲).

بحث

تنها استرپتوکوک اختصاصی در گروه A که از نظر کلینیکی مهم است، استرپتوکوکوس پیوژنز می‌باشد. نمونه‌های کلینیکی دارای این ارگانیسم توسط آزمایشگاه‌ها به عنوان استرپتوکوک β همولیتیک گروه A گزارش می‌شوند که بعضی مواقع به آن GAS یا GABHS می‌گویند. ساختمان آنتی‌ژنی استرپتوکوکوس پیوژنز از آنتی‌ژن‌های دیواره سلولی کربوهیدرات C (آنتی‌ژن لانسفیلد) و پروتین M، پروتین T و R و نوکلئوپروتین‌ها تشکیل شده است. کپسول، انواع همولیزین‌ها (استرپتولیزین O و S)، هیالورونیداز، اگزوتوکسین‌های تب‌زا یا همان سم اریترورژنیک یا پیروژنیک که توسط باکتری‌فاج معتدل کد می‌شود (*speA/B/C*)، نوکلئوتیداز دی‌فسفوپیریدین، استرپتودورناز، استرپتوکیناز (فیبرینولیزین) و DNase از عوامل مؤثر در بیماری‌زایی این باکتری می‌باشند (۹و۷). این باکتری مسبب بیماری‌های مختلفی از قبیل گلودرد چرکی (فارنژیت)، سلولیت، زرد زخم، تب ماحملک، سندرم شوک توکسیک استرپتوکوکی، پیودرمی و یک سری عوارض غیرچرکی (تب روماتیسمی و گلوآمرولوفریت) می‌باشد. منشأ استرپتوکوک‌های گروه A، افراد حامل این ارگانیسم‌ها می‌باشد. این شخص می‌تواند به عفونت بالینی یا عفونت تحت بالینی مبتلا باشد، یا این‌که ناقلی باشد که استرپتوکوک‌ها را از طریق قطرات مترشحه از دستگاه تنفسی یا پوست خود به افراد دیگر منتقل کند. خطرناک‌ترین منشا انتشار ارگانیسم‌ها، ترشحات بینی فردی است که حامل استرپتوکوک‌های β -همولیتیک می‌باشد (۱۵-۱۹). تعیین گروه و تیپ استرپتوکوک‌ها از نظر ایمونولوژیک، روش‌های با ارزشی برای پیگیری اپیدمیولوژیک زنجیره انتقال هستند. در ایجاد سندرم شوک سمی مانند



شکل ۱: نمایی از الکتروفورز ژن *spy*. نتیجه بررسی فراوانی ژن *Spy* ستون‌ها به ترتیب از چپ به راست: M مارکر، کنترل مثبت، کنترل منفی.



شکل ۲: تایید کلونینگ توسط کلونال سلکشن (A) و PCR با پرایمرهای M13 (B).

توسط آزمون PCR و در نهایت با سکانس محصول PCR، ورود ژن‌های *spy* به باکتری/شریشیاکلی اوریگامی تایید گردید. (ج) نتایج آزمون *Real time PCR* به منظور تایید نتایج کلونینگ، DNA کلنی‌های استخراج شده و cDNA ساخته شد. نتیجه تایید میزان بیان ژن *spy* توسط آزمون *Real time PCR* بررسی شد. در این مطالعه از غلظت‌های ۰/۱ میلی‌لیتر و ۰/۰۱ میلی‌لیتر از IPTG به عنوان تیمار استفاده شد. در طی واکنش از منحنی ذوب برای بررسی اختصاصیت واکنش‌ها استفاده گردید. نتایج که نشان دهنده بیان بیشتر ژن *spy* در وکتور بیانی بود. نتایج پس از ۴ ساعت تیمار در غلظت ۰/۰۱ میلی‌لیتر از IPTG نشان داد که میانگین Fold change در سویه‌های تحت تیمار در مقایسه با سویه‌های غیرتیمار برابر ۰/۳۵ بود. این نتایج از نظر

استرپتوکوکوس اورئوس، باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز M18 در پایین دست spb N کدگذاری شده است (۲۵).

در سال ۲۰۱۲ در ایتالیا، Chiappini و همکاران دریافتند که Spy CEP به عنوان یک واکسن بالقوه در برابر استرپتوکوکوس پیوژنز توصیف شده است و ما نشان دادیم که Spy CEP مرتبط با سطح توسط آنتی‌بادی‌های خاص شناسایی شد. در شرایط آزمایشگاهی، چنین آنتی‌بادی‌هایی با اثرات مهاری Spy CEP بر جذب PMN با واسطه کموکین مقابله کردند. بنابراین، آنتی‌بادی‌های α -Spy CEP ممکن است هم به طور مستقیم با فعال کردن اپسون فاگوسیتوز و هم به طور غیرمستقیم با خنثی کردن یک عامل بیماری‌زای مهم، برای میزبان مفید باشد. مدل حیوانی که ما به کار گرفتیم، نویدبخش کاربرد وسیعی در مطالعه پاتوژن باکتریایی است.

در ایتالیا، Abate و همکاران در مطالعه ای با عنوان شبیه‌سازی، بیان، خالص سازی، تبلور و تجزیه و تحلیل اولیه پراش اشعه ایکس Spy CEP، یک آنتی‌ژن کاندید برای واکسن علیه استرپتوکوک پیوژنز دریافتند که Spy CEP ایمونوژن است و در مدل‌های حیوانی از عفونت‌های GAS محافظت می‌کند. به منظور توصیف ساختاری این نامزد امیدوارکننده واکسن، چندین ساختار بیان پروتئین Spy CEP طراحی، شبیه‌سازی شد، در شریشا کلی تولید شد، با کروماتوگرافی میل ترکیبی خالص سازی شد و تحت آزمایش‌های کریستالیزاسیون قرار گرفت. کریستال‌های یک شکل سلنومتیونین از یک اکتو دومین Spy CEP تقریباً به دست آمد (۲۷).

میزان بیان ژن spy توسط آزمون Real time PCR بررسی شد. در این مطالعه از غلظت‌های ۰/۱ میلی‌لیتر و ۰/۰۱ میلی‌لیتر از IPTG به عنوان تیمار استفاده شد. حال می‌توان به صورت توافقی سیکلی که در آن محصولات وارد فاز exponential می‌شود را به عنوان سیکل مرجع در نظر گرفت. در اینجا حد آستانه ورود به فاز exponential در نظر گرفته شد. مفهوم Ct برای همه دستگاه‌ها یکسان است و به مفهوم سیکلی است که در آن محصولات real time از یک حد آستانه فراتر رفته است.

استافیلوکوکوس اورئوس، باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز (به خصوص سروتیپ A سم اریترورژنیک) دارای خاصیت سوپراآنتی‌ژنی بوده و سیستم ایمنی را به شدت فعال کرده و سبب عوارض عفونت می‌گردد (۲۰ و ۲۱). استرپتوکوک پیوژنز پروتئیناز پوشش سلول (SpyCEP) یک پروتئیناز سرین در معرض سطح است که کموکین‌ها را غیرفعال می‌کند، جذب نوتروفیل‌ها و پاکسازی باکتریایی را مختل می‌کند و ایمنی‌زایی امیدوارکننده‌ای را در مدل‌های بالینی نشان داده است (۹ و ۲۲).

در مطالعه پیش رو از ۱۰۰ نمونه سوال حلق جمع‌آوری شده از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه مرکز طبی اطفال شهر تهران، ۱۲ سویه استرپتوکوکوس پیوژنز جدا شده که ۱۱ سویه حاوی ژن Spy بود. این نتایج با مطالعه Fazeli و همکاران مطابقت داشت (۲۳). این نتایج با تفاوتهای جزئی در برخی دیگر کشورها نیز نشان داده شده است. باری مثال شیوع ایزوله‌های حاوی ژن Spy در سودان ۲۱٪ گزارش شده است (۲۴).

Armstrong و همکاران (۲۰۱۶) به شناسایی یک باکتریوسین دو جزئی کلاس IIb در استرپتوکوک پیوژنز با استفاده از فناوری بیان درون تنی مبتنی بر رکامبیناز پرداختند. استرپتوکوکوس پیوژنز یک پاتوژن باکتریایی برجسته در سطح جهانی است که جهت میزبانی انسان را نشان می‌دهد، اما عوامل باکتریایی مسئول توانایی استرپتوکوکوس پیوژنز برای رقابت در این طاقچه بیولوژیکی محدود به خوبی شناخته نشده است. با استفاده از یک سیستم فن‌آوری بیان درون تنی مبتنی بر رکومبیناز مهندسی شده (RIVET)، یک ناحیه پروموتور القا شده در داخل بدن در بالادست یک سیستم باکتریوسین کلاس IIb پیش‌بینی شده در سروتیپ استرپتوکوکوس پیوژنز M18 سویه MGAS 8232 شناسایی شد. این عنصر پروموتور تحت شرایط آزمایشگاهی آزمایشگاهی فعال نبود، اما به شدت در نازوفارنکس موش القا شد. بیان نوترکیب پپتیدهای باکتریوسین بالغ پیش‌بینی شده استرپتوکوکوس پیوژنز (SpbM و SpbN تعیین شده) نشان داد که هر دو پپتید برای فعالیت ضد میکروبی مورد نیاز بودند. با استفاده از یک آزمایش عملکرد در لاکتوکوکوس لاکتیس، ما بیشتر نشان داده شد که عملکرد ایمنی

نتیجه گیری

مطالعه حاضر بیانگر اهمیت روش‌های کلونینگ برای بررسی مطالعه بیشتر خصوصیات بیماری‌زایی میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. علاوه بر این، بیان مناسب ژن *spy* در روش کلونینگ در وکتور/شریشیا کلی اوریگامی و پلاسمید pET-26b تایید این نتایج با روش Real-Time PCR را نشان می‌دهد. این روش کلونینگ برای مطالعات آینده به نظر کاربردی و مناسب خواهد بود.

ملاحظات اخلاقی

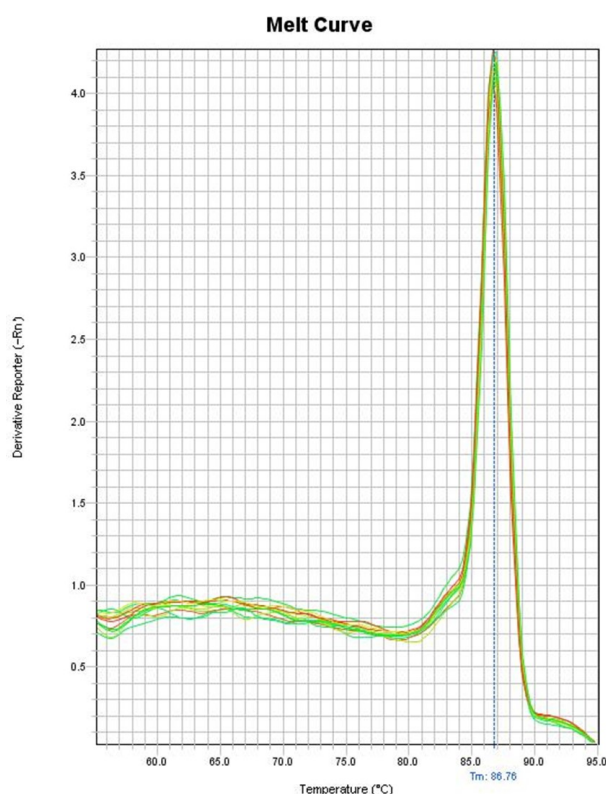
نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی و انتشار دوگانه و تحریف داده‌سازی را در این مقاله رعایت گردیده است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک انجام گردید و از مسئولین مربوطه تشکر و قدردانی می‌گردد.

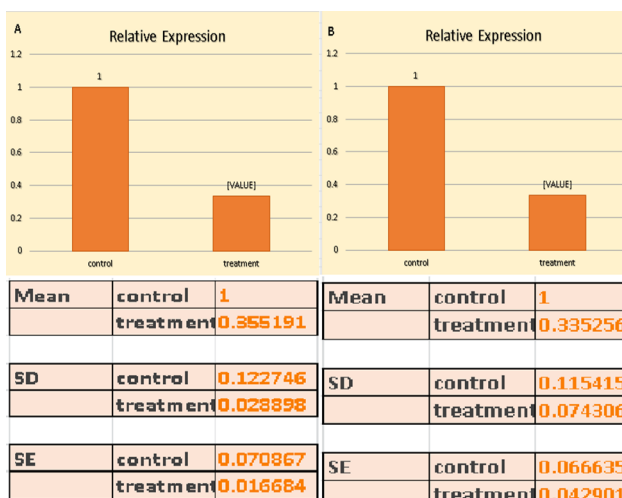
تعارض منافع

وجود ندارد.



شکل ۳: حد آستانه (ct) در سویه‌های کلون شده با غلظت‌های مختلف IPTG.

نتایج پس از ۴ ساعت تیمار در غلظت ۰/۰۱ میلی‌لیتر از IPTG نشان داد که میانگین Fold change در سویه‌های تحت تیمار در مقایسه با سویه‌های غیر تیمار برابر ۰/۳۵ بود. این نتایج از نظر آماری بسیار معنی‌دار بود (۰/۰۰/۰) (نمودار ۱).



نمودار ۱: نتایج آنالیز آماری در غلظت‌های مختلف IPTG.

References

1. Euler CW, Ryan PA, Martin JM, Fischetti VA. M. SpyI, a DNA methyltransferase encoded on a *mefA* chimeric element, modifies the genome of *Streptococcus pyogenes*. Journal of bacteriology.
2. Mirjamali Mehrabadi NOS, Soufian S, Abtahi H. Production and Purification of Enzymatic Region of Streptococcal Hyaluronidase in E.coli. Journal of Arak University of Medical Sciences. 2014;17(4):67-75.
3. Bagheri H, Azadegan Qomi H, Amini K. Isolation and Cloning of *Streptococcus Pneumoniae* Surface Adderson E. E., Shikhman A. R., Ward K. E., and Cunningham M. W. Molecular analysis of polyreactive monoclonal antibodies from rheumatic carditis: human anti-N-acetyl-glucosamine/anti-myosin antibody V region genes J. Immunol. 161 1998 2020 -2031
4. Adrezejewski C. Jr., Rauch J., Stollar B. D., and Schwartz R. S. Antigen binding diversity and idiotypic cross-reactions among hybridoma autoantibodies to DNA J. Immunol. 126 1980 226 -231
5. Ahmed S. and Ayoub E. M. Severe, invasive group A streptococcal disease and toxic shock Pediatr. Ann. 27 1998 287 -292
6. Ahmed S., Ayoub E. M., Scornik J. C., Wang C.-Y., and She J.-X. Poststreptococcal reactive arthritis: clinical characteristics and association with HLA-DR alleles Arthritis Rheum. 41 1998 1096 -1102
7. Akerstrom B., Brodin T., Reis K., and Bjorck L. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies J. Immunol. 135 1985 2589 -2592
8. Akesson P., Cooney J., Kishimoto G., and Bjorck L. Protein H—a novel IgG binding bacterial protein Mol. Immunol. 27 1990 523 -531
9. Akesson P., Sjöholm A. G., and Bjorck L. Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function J. Biol. Chem. 271 1996 1081 -1088
10. Alberti S., Ashbaugh C. D., and Wessels M. R. Structure of the *has* operon promoter and regulation of hyaluronic acid capsule expression in group A streptococcus Mol. Microbiol. 28 1998 343 -353
11. Allen A. J., Leonard H. L., and Swedo S. E. Case study: a new infection-triggered, autoimmune subtype of pediatric OCD and Tourette's syndrome J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry 34 1995 307 -311
12. Alouf J. E. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin) Pharmacol. Ther. 11 1980 661 -717

13. Alouf J. E., Knoll H., and Kohler W. The family of mitogenic, shock-inducing and superantigenic toxins from staphylococci and streptococci Sourcebook of bacterial protein toxins. Alouf J. E. and Freer J. H. 1991 Academic Press London, United Kingdom
14. Andres G. A., Accinni L., Hsu K. C., Zabriskie J. B., and Seegal B. C. Electron microscopic studies of human glomerulonephritis with ferritin conjugated antibody J. Exp. Med. 123 1966 399
15. Anthony B. F., Kaplan E. L., Wannamaker L. W., Briese F. W., and Chapman S. S. Attack rates of acute nephritis after type-49 streptococcal infection of the skin and of the respiratory tract J. Clin. Investig. 48 1969 1697
16. Antone S. M., Adderson E. E., Mertens N. M. J., and Cunningham M. W. Molecular analysis of V gene sequences encoding cytotoxic anti-streptococcal/anti-myosin monoclonal antibody 36.2.2 that recognizes the heart cell surface protein laminin J. Immunol. 159 1997 5422 -5430
17. Ashbaugh C. D., Alberti S., and Wessels M. R. Molecular analysis of the capsule gene region of group A streptococcus: the hasAB genes are sufficient for capsule expression J. Bacteriol. 180 1998 4955 -4959
18. Ashbaugh C. D., Warren H. B., Carey V. J., and Wessels M. R. Molecular analysis of the role of the group A streptococcal cysteine protease, hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft tissue infection J. Clin. Investig. 102 1998 550 -560
19. Ayoub E. M. Resurgence of rheumatic fever in the United States Postgrad. Med. 92 1992 133 -142
20. Chiappini N, Seubert A, Telford JL, Grandi G, Serruto D, Margarit I, Janulczyk R. Streptococcus pyogenes SpyCEP influences host-pathogen interactions during infection in a murine air pouch model. PloS one. 2012 Jul 27;7(7):e40411.
21. McKenna, S., Malito, E., Rouse, S.L., Abate, F., Bensi, G., Chiarot, E., Micoli, F., Mancini, F., Moriel, D.G., Grandi, G. and Mossakowska, D., 2020. Structure, dynamics and immunogenicity of a catalytically inactive CXC chemokine-degrading protease SpyCEP from *Streptococcus pyogenes*. Computational and Structural Biotechnology Journal, 18, pp. 650-660.
22. Kioushi D, Lindow SE. Ice nucleation and its application. Current Opinion in Biotechnology. 1992 Jun 1;3(3):303-6.
23. Homer J, Lee TC. Bacterial ice nucleation and its potential application in the food industry. Trends in Food Science & Technology. 1995 Aug 1;6(8):259-65.
24. Orser CI, Staskawicz BJ, Panopoulos NJ, Dahlbeck DO, Lindow AE. Cloning and expression of bacterial ice nucleation genes in Escherichia coli. Journal of bacteriology. 1985 Oct;164 (1):359-66.
25. Aritan P, Warren G. Bacterial ice-nucleation proteins. Trends in biochemical sciences. 1989 May 1;14(5):179-82.

26. Johnson CM, Yang S, Sellins KS, Frank GR. Selection of HPRT primers as controls for determination of mRNA expression in dogs by RT-PCR. Veterinary immunology and immunopathology. 2004;99(1-2):47-51.
27. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. BioMed research international. 2014;2014.
28. Reddington SC, Howarth M. Secrets of a covalent interaction for biomaterials and biotechnology: SpyTag and SpyCatcher. Current opinion in chemical biology. 2015 Dec 1;29:94-9.
29. Cunningham MW. Pathogenesis of group a streptococcal infections. Clin Microbiol Rev 2000; 13: 470-511.
30. Green MD, Beall B, Marcon MJ. Multicentre surveillance of the prevalence and molecular epidemiology of macrolide resistance among pharyngeal isolates of group A streptococci in the USA. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 1240-3.
31. Giovanetti E, Magi G, Brenciani A, Spinaci C, Lupidi R, Facinelli B, et al. Conjugative transfer of the erm(A) gene from erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* to macrolide-susceptible *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis* and *Listeria innocua*. J Antimicrob Chemother 2002; 50: 249-52.
32. Javan B, Straut M, Cretoi S, Surdeanu M, Ungureanu V, van der Linden M, et al. Molecular characterization of invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* isolates from Romania. J Med Microbiol 2008; 57: 1354-63.
33. Aliyari E, Kim S. Decline in erythromycin resistance in group A Streptococci from acute pharyngitis due to changes in the emm genotypes rather than restriction of antibiotic use. Korean J Lab Med 2010; 30: 485-90.
34. Bazri C, Cohen R, Levy C, Bidet P, Thollot F, Wollner A, et al. Decline in macrolide-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates from French children. In J Med Microbiol 2012; 302: 300-3.
35. Zhang A, Bassi AS. Principles and biotechnological applications of bacterial spy nucleation. Critical reviews in biotechnology. 1991 Jan 1;11(3):277-95.
36. Abtahi H, Moradkhani A, Pakzad I. Cloning and Expression of the *Streptococcus pyogenes* Hyaluronidase Gene in *E. coli*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 2012;6(2):95-9.
37. Armstrong BD, Herfst CA, Tonial NC, Wakabayashi AT, Zeppa JJ, McCormick JK. Identification of a two-component Class IIb bacteriocin in *Streptococcus pyogenes* by recombinase-based in vivo expression technology. Scientific Reports. 2016;6(1):1-13.
38. Helal ZM, Rizk DE, Adel El-Sokkary MM, Hassan R. Prevalence and characterization of *Streptococcus pyogenes* clinical isolates from different hospitals and clinics in Mansoura. International Journal of Microbiology. 2020;2020.

39. Long S, Truong L, Bennett K, Phillips A, Wong-Staal F, Ma H. Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from *Escherichia coli*. Protein expression and purification. 2006;46(2):374-8.
40. Berge A. and Sjobring U. PAM, a novel plaminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes* J. Biol. Chem. 34 1993 25417 -25424
41. Berkower C., Ravins M., Moses A. E., and Hanski E. Expression of different group A streptococcal M proteins in an isogenic background demonstrates diversity in adherence to and invasion of eukaryotic cells Mol. Microbiol. 31 1999 1463 -1475.
42. Zhou M-Y, Gomez-Sanchez CE. Universal TA Cloning. Current Issues in Molecular Biology. 2000; 2(1):1-7.
43. Zhou, Ming-Yi, and Celso E. Gomez-Sanchez. 2000. "Universal TA Cloning" Current Issues in Molecular Biology 2, no. 1: 1-7.
44. Yao S, Hart DJ, An Y. Recent advances in universal TA cloning methods for use in function studies. Protein Engineering, Design and Selection. 2016 Nov 1;29(11):551-6.