# Cloning of *Streptococcal pyogenes* Exotoxin, A gene in *E. coli*

**Siasi E.*[1], Salehi M.[1], Mirjalili S.[2]**

1. *Department of Microbiology, Collage of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.* emi_biotech2006@yahoo.com
2. *Department of Biotechnology, Collage of science, North Tehran Branch, Islamic Azad University., Tehran, Iran.*

## Abstract

Aim and Background: Exotoxin A is one of the toxins which produce by group a *streptococcuses*. This Toxin is a protein soluble substance which causes scarlet fever and different kinds of infections as a super antigen. This toxin has antigenic property and special anti-toxins can neutralize it. In this research, was studied production of *Streptococcus pyogenes* exotoxin A recombinant protein in *E. coli* by cloning.

Materials and methods: At the first, genome of the bacteria was extracted and used PCR. Then agarose gel electrophoresis was performed for detection of size and quality of the resulting amplicons. According to TA Cloning kit protocol, the target gene was inserted in to the PTG19 Cloning vector and the recombinant plasmid was inserted in to the *E. coli XL1Blue* bacteria. Eventually checking the sequencing data obtained from cloned gene in the vectore compared with the refrenece sequenece obtained from the NCBI database, confirm the success of the gene cloning by its correct sequence.

Results: The results showed that PCR product is a fragment with a length of about 708 bais pairs. This is for the first time that the *exotoxin A* gene was cloned by the TA Cloning in the PTG19 Cloning vector and the *E. coli XL1Blue* host cell. The results of sequencing were confirmed presence of exotoxine A gene, *speA.*

Conclusion: The *speA* gene was amplified and correct cloning was confirmed by TA Cloning with PTG19 vector and *E. coli XL1Blue* host cell.

Keywords: Exotoxin A, *Streptococcus pyogenes*, *speA* gene, *E. coli XL1Blue*, Cloning

# کلونینگ ژن اگزوتوکسین A استرپتوکوکوس پایوژنز در اشریشیا کلی

**الهام سیاسی[1]*، میترا صالحی[1]، سیمین میر جلیلی[2]**

۱. *گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.*
۲. *گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.*

## چکیده

**سابقه و هدف:** اگزوتوکسین A یکی از توکسین‌هایی است که توسط استرپتوکوکوس‌های گروه A تولید می‌شود. این توکسین ماده محلول پروتئینی است که سبب ایجاد راش در تب مخملک شده و به عنوان سوپر آنتی‌ژن موجب بروز عفونت‌های منتشر می گردد. این توکسین خاصیت آنتی‌ژنیک داشته و آنتی‌توکسین اختصاصی علیه آن تولید می‌شود که قادر به خنثی کردن توکسین است. هدف از این تحقیق کلون و بررسی تولید پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A استرپتوکوکوس پایوژنز[1] در اشریشیا کلی[2] بود.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا ژنوم باکتری تخلیص شد و پس از انجام PCR به منظور بررسی اندازه و کیفیت قطعه تکثیر یافته الکتروفورز روی ژل آگارز صورت گرفت. طبق پروتوکل کیت TA کلونینگ، ژن مورد نظر وارد وکتور PTG19 گردید و پلاسمید نوترکیب حاصل به باکتری اشریشیا کلی *XL1-Blue* داخل گردید. در نهایت بررسی داده‌های حاصل از توالی‌یابی قطعه کلون شده در وکتور و مقیاسه آن با توالی مرجع در بانک اطلاعاتی NCBI ، صحت کلون این ژن با توالی صحیح تأیید شد.

**یافته‌ها:** محصول PCR یک قطعه با طول ۷۰۸ جفت باز بود. ژن اولین بار با استفاده از تکنیک TA کلونینگ در وکتور PTG19 و سلول میزبان اشریشیا کلی *XL1-Blue* کلون گردید. نتایج تعیین توالی قطعه کلون شده نشان دهنده شباهت کامل به ژن *speA*، کد کننده اگزوتوکسین A بود.

**بحث:** ژن *speA* از باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز تکثیر شد و با انجام تکنیک TA کلونینگ در وکتور PTG19 و سلول میزبان باکتری اشریشیا کلی *XL1-Blue*، صحت کلونینگ مورد تأیید قرار گرفت.

**کلمات کلیدی:** اگزوتوکسین A، استرپتوکوکوس پایوژنز، ژن *speA*، *کلونینگ*، اشریشیا کلی*XL1-Blue*

[1] *Streptococcus pyogenes*
[2] *Escherichia coli*

## مقدمه

عفونت‌های چرکی و بیماری‌های حاصل از عفونت استرپتوکوکی مثل تب حاد روماتیسمی و گلومرولونفریت منجر به عوارض قابل توجه و زیان‌های اقتصادی در سطح جهانی گردیده است. برخلاف تلاش‌های انجام شده در طول چندین دهه اخیر واکسن مناسبی به منظور پیشگیری از ابتلا به این عفونت‌ها ساخته نشده است. تمرکز بیشتر مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته بر روی طراحی واکسن بر مبنای پروتئین M استرپتوکوکوس‌ها بوده است. به دلیل وجود بیش از ۱۵۰ سروتیپ از پروتئین M، هر فردی ممکن است به عفونت‌های مکرر استرپتوکوکوس پایوژنز مبتلا گردد. بنابراین واکسن‌های طراحی شده نمی توانند سبب ایجاد مصونیت در برابر عفونت‌های ایجاد شده از همه سروتیپ‌های متفاوت M شوند (۱ و ۲). از این رو مطالعات برای طراحی واکسن‌های نوترکیب صورت گرفت و در این زمینه طی دهه‌های اخیر واکسن هایی بر اساس آنتی ژن‌های محافظ استرپتوکوکی، پروتئین‌های اتصالی فیبرونکتین، اگزوتوکسین A، B و C باکتری، استراز، سیستنیل پروتئاز، هیالورونیداز C5a، پپتیداز و در سال‌های اخیر نیز نوکلئاز A این باکتری، طراحی شده‌اند (۳، ۴ و ۵).

در میان توکسین‌های خارج سلولی استرپتوکوکوس پایوژنز اگزوتوکسین A نقش مهمی در بیماری‌زایی دارد و به عنوان سوپر آنتی‌ژن در این باکتری شناخته می‌شود. این توکسین ماده محلول پروتئینی است که باعث مهار پاسخ میزبان به عفونت می‌شود، همچنین خاصیت آنتی‌ژنیک داشته و وقتی مقدار کمی از سایتوتوکسیک آن به کار رود علیه آن آنتی‌بادی اختصاصی ساخته می‌شود که بر اساس نتایج مطالعات این آنتی‌بادی بسیار محافظت کننده است.

**آدرس نویسنده مسئول:** گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

**پست الکترونیک:** emi_biotech2006@yahoo.com

**تاریخ دریافت مقاله:** ۱۴۰۱/۰۵/۲۲

**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۴/۲۰

بنابراین به عنوان یک کوفاکتور مهم برای کاندید واکسن مورد توجه قرار دارد (۶ و ۷). در مطالعات بسیاری تولید اگزوتوکسین A و همچنین سایر اگزوتوکسین‌های آن مانند B و C از استرپتوکوکوس‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها مورد توجه قرار گرفته است (۸ ، ۹ و ۱۰). در سال ۲۰۰۸ تحقیقاتی توسط یوریچ برای طراحی واکسن نوترکیب علیه عفونت‌های استرپتوکوکوس پایوژنز انجام شد. این واکسن بر مبنای اگزوتوکسین A و B این باکتری طراحی شد. واکسیناسیون موش با این اگزوتوکسین‌های باکتری منجر به ایجاد مصونیت در برابر عفونت‌های کشنده استرپتوکوکوس پایوژنز گردید (۱۱). روش‌های تولید پروتئین‌های نوترکیب به عنوان روش‌های مورد نیاز و اساسی در علم بیوتکنولوژی امکان تولید بسیاری از مولکول‌های حیاتی مانند داروها، انسولین و پروتئین‌های خون، هورمون‌ها مثل هورمون‌های رشد و واکسن ها و غیره را فراهم می‌نماید. برای تولید پروتئین های نوترکیب از تکنیک‌های کلونینگ استفاده می‌شود که در آن ژن مورد نظر توسط حامل‌هایی به نام وکتور درون باکتری‌های مخصوصی وارد شده تا به عنوان جزئی از ژن باکتری و به همراه آن تکثیر شده و پروتئین مورد نظر همراه با سایر پروتئین‌های باکتری بیان گردد (۱۲). برای طراحی واکسن، باید پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A از ژن *speA* استرپتوکوکوس پایوژنز تهیه گردد. *speA* ژنی با حدود ۷۵۳ جفت باز است. یک توالی R.B.S[3] که در باسیلوس ها، استافیلوکوکوس‌ها، استرپتوکوکوس‌ها و اشریشیا کلی مشابه می‌باشد، دارد. پروموتور ژن استرپتوکیناز نیز در ناحیه ۳۵ جفت باز توالی بالادست[4] از توالی R.B.S قرار دارد. این ژن پروتئینی با ۲۵۱ آمینواسید و وزن مولکولی حدود ۲۹/۲۴۴ دالتون تولید می‌کند (۷). برای این منظور از این ژن و تکنولوژی تولید پروتئین نوترکیب استفاده می‌شود. تکنولوژی تولید پروتئین نوترکیب شامل تولید پروتئین هایی است که به سهولت از منابع طبیعی تخلیص نمی شوند. این روش ایجاد تعداد مشخص و محدودی از اسید امینه‌های جانشین برای رفع

[3] Ribosome Binding Site
[4] Up Stream

سمیت پروتئین‌های اصلی را دنبال می‌کند. توکسوئیدهای نوترکیب علاوه بر اینکه توانایی جایگزینی توکسوئیدهای کلاسیک را دارند، با استفاده از مهندسی ژنتیک وارد باکتری‌های زنده ضعیف شده می‌شوند. چنین واکسن‌های زنده‌ای برای اکثر بیماری‌ها تنها با توزیع یک دوز مصونیت ایجاد می‌کند. ژن کلونینگ فرآیندی است که طی آن توالی مشخصی از DNA را جداسازی می‌کنند تا نسخه‌های یکسانی از آن را در محیط طبیعی (سلول یا بافت زنده) به دست آورند. به علاوه دارای کاربردهای پزشکی از قبیل ژن درمانی و کاربردهای صنعتی نظیر تولید مقدار زیادی از یک پروتئین می‌باشد (۱۳). همان‌طورکه اشاره گردید تلاش‌های بسیاری به منظور طراحی واکسن علیه عفونت با این باکتری صورت گرفته است که از بین آنها بیشترین تمرکز بر روی طراحی واکسن بر مبنای اگزوتوکسین A بوده است. زیرا استفاده از روش‌های سنتی تولید واکسن که در آنها از ارگانیسم عفونی به صورت کشته شده یا تضعیف شده استفاده می‌شود به دلیل وجود احتمال ابتلا به بیماری و مرگ مورد توجه قرار نمی گیرند. به همین دلیل تمرکز بیشتر تحقیقات، طراحی واکسن‌های نوترکیب می‌باشد که در آنها از یک ژن ارگانیسم عفونی یا فراورده آن که خاصیت آنتی‌ژنیک دارد استفاده می‌شود، این گونه واکسن‌ها علاوه بر حذف خطر ابتلا به بیماری و مرگ، به دلیل تحریک پاسخ ایمنی سلولی و هومورال نیاز به واکسن‌های یادآوری نداشته و همچنین به نگه‌داری در یخچال مانند واکسن‌های سنتی نیاز ندارند و سبب ایجاد ایمنی کافی شده و از نظر اقتصادی نیز به صرفه می باشند. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی کلونینگ اگزوتوکسین A استرپتوکوکوس پایوژنز بود که می‌تواند به عنوان کاندیدی برای طراحی واکسن پروتئین نوترکیب در آینده به کار گرفته شود.

## مواد و روش‌ها

### ۱- کشت باکتری

سویه استاندارد استرپتوکوکوس پایوژنز با ATCC19615 از انسیتو پاستور تهران خریداری گردید. این باکتری بصورت آمپول لیوفیلیزه بود که برای کشت دادن آن طبق مراحل زیر عمل شد. پس از شکستن آمپول در کنار شعله و شرایط استریل حدود ۱ سی‌سی از محیط TSB[5] را درون ویال ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس باکتری بر روی محیط کشت بلاد آگار کشت خطی داده شد. چون استرپتوکوکوس‌ها باکتری‌های گرم مثبت و دیر رشد و پرنیاز هستند در محیط بلاد آگار و در شرایط دارای دی اکسید کربن کشت داده شدند.

### ۲- استخراج DNA باکتری

از کلنی‌های تازه استرپتوکوکوس پایوژنز ۲۴ ساعته برای استخراج ژنوم باکتری استفاده شد و با استفاده از کیت تجاری پیشگامان انتقال ژن دانشگاه شهید بهشتی استخراج ژنوم صورت گرفت.

### ۳- اندازه‌گیری غلظت DNA

غلظت DNA با طیف سنجی جذبی اشعه ماورا بنفش اندازه‌گیری شد. جذب در ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. زیرا مقدار اشعه ماورا بنفش جذب شده توسط یک محلول با مقدار DNA موجود در نمونه نسبت مستقیم دارد. در طول موج ۲۶۰ نانومتر، یک واحد جذب معادل۵۰ میکروگرم DNAدو رشته‌ای در هر میلی‌لیتر است.

### ۴- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

برای تکثیر ژن *speA* از نمونه DNA سویه استاندارد استرپتوکوکوس پایوژنز با ATCC19615 استفاده شد. توالی پرایمرها، مواد مورد نیاز و برنامه دستگاه PCR به ترتیب در جداول شماره ۱، ۲ و ۳ آورده شده است.

### ۵- الکتروفورز برای مشاهده محصول PCR

برای بررسی نتایج واکنش PCR الکتروفورز بر روی ژل آگارز انجام گرفت. سپس نمونه‌ها با اتیدیوم‌برامید رنگ آمیزی شد و در دستگاه ژل داک عکس برداری شد.

### ۶- کلونینگ محصولات PCR

[5] Tryptic Soy Broth

به منظور کلونینگ سریع‌تر و مؤثرتر محصول PCR از روش TA-Cloning استفاده شد. کیت PCR TA-Cloning از شرکت سینا ژن تهیه شد. در این روش از یک وکتور خطی به نام PTG19-T که در انتهای ´۳ آن باز تیمین قرار دارد استفاده شد (این آنزیم فاقد خاصیت Proof reading می‌باشد). استفاده از وکتور خطی PTG19-T که در انتهای ´۳ خود دارای باز تیمین است منجر به اتصال مستقیم و سریع و آسان محصول PCR به وکتور کلونینگ می‌گردد، سپس آنزیم T4 DNA ligase با تشکیل پیوند کووالان اتصال DNA مورد نظر به وکتور خطی را محکم می‌کند، در نتیجه یک مولکول حلقوی که حاوی ژن مورد نظر است تشکیل شده که توانایی تکثیر خود به خود را در میزبان مناسب مانند اشریشیا کلی دارا می باشد. در این روش نیاز به مرحله هضم آنزیمی نبود و این مرحله حذف شد. این وکتور به علاوه دارای ژن *lacZ* به منظور غربالگری سفید/آبی، پرایمر M13 برای PCR و توالی‌یابی، و آنزیم محدود کننده BamH1 بود. توالی MCS (Multiple cloning sites) و پرایمرهای چپ و راست M13 در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

**جدول شماره ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر ژن *speA***

| نام ژن | توالی پرایمر | طول قطعه تکثیر شده |
|---|---|---|
| *speA* | F: 5´- ATG GAA AAC AAT AAA AAA GTA TTG-3´<br>R : 5´- TTA CTT GGT GTT AGG TAG CTT C-3´ | 708 bp |

**جدول شماره ۲- مواد مورد نیاز برای PCR با آنزیم Taq DNA پلی‌مراز در حجم ۲۰ میکرولیتر**

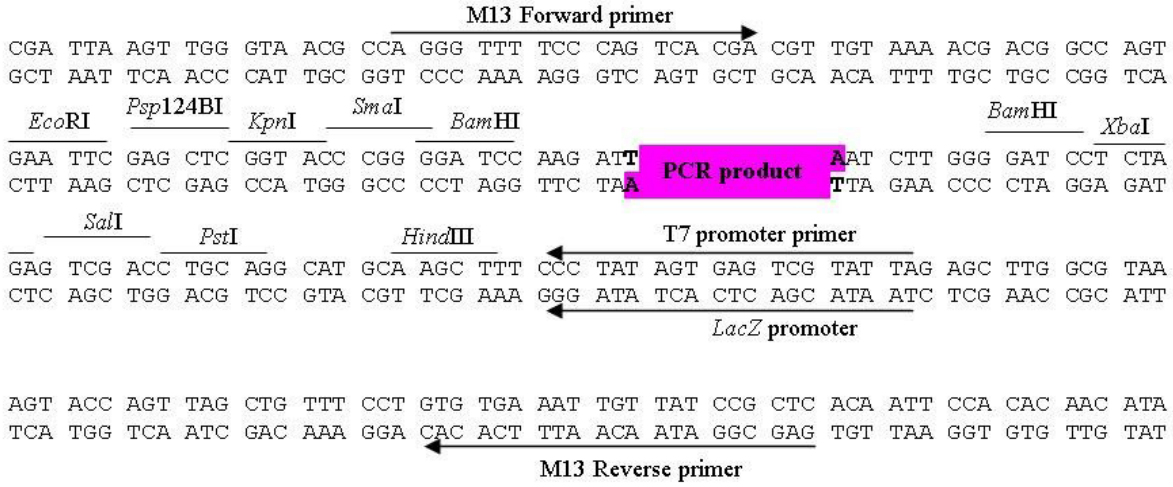
| مواد | مقدار (میکرولیتر) |
|---|---|
| *Master Mix | ۱۰ |
| پرایمر Forward | ۱ |
| پرایمر Reverse | ۱ |
| DNA ژن مورد نظر | ۴ |
| آب | ۴ |
| جمع | ۲۰ |

*Master Mix شامل بافر PCR، $MgCL_2$ ، dNTPs و Taq DNA پلیمراز بود.

**جدول شماره ۳- برنامه زمانی– دمایی دستگاه PCR**

| مرحله | دما (درجه سانتی‌گراد ) | زمان |
|---|---|---|
| **Denaturation اولیه** | ۹۵ | ۳ ثانیه |
| **Denaturation ثانویه** | ۹۵ | ۳۰ ثانیه |
| **Annealing** | ۵۴/۵ | ۳۰ ثانیه |
| **Extension اولیه** | ۷۲ | ۴۵ ثانیه |
| **Extension نهایی** | ۷۲ | ۲۵ دقیقه |

*مدت زمان کامل یک ساعت و پنجاه دقیقه بود. تعداد دفعات ۳۰ سیکل که شامل ۲۹ بار مکرر به همراه دور اول بود.




**شکل شماره ۱- توالی MCS وکتور کلونینگ PTG19 و پرایمرهای M13**

### ۷- اتصال محصول PCR در وکتور کلونینگ PTG19-T (Ligation)

مرحله Ligation با مواد جدول شماره ۴ انجام شد. مجموعه مواد در یک ویال ۰/۲ ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد که برای این منظور از دستگاه hot plate استفاده شد.

**جدول شماره ۴- مواد مورد نیاز جهت انجام مرحله Ligation**

| ماده | مقدار ( میکرولیتر) |
|---|---|
| وکتور کلونینگ PTG19-T | ۲ |
| آنزیم T4 Ligase | ۱ |
| بافر | ۱ |
| محصول PCR | ۱/۵ |
| آب | ۴/۵ |
| جمع | ۱۰ |

**۸- انتقال وکتور به میزبان اشریشیا کلی *XL1-Blue***

**۸-۱- آماده کردن محیط‌های کشت باکتری (مایع و جامد)** برای تهیه محیط کشت مایع ۲۵ گرم از پودر محیط کشت LB Broth را در یک لیتر آب مقطر حل شد و برای تهیه محیط کشت جامد ۲۵ گرم از پودر محیط کشت LB Broth همراه با ۱۵ گرم پودر آگار در یک لیتر آب مقطر حل شد.

**۸-۲- آماده کردن سلول‌های باکتریایی پذیرنده وکتور**

باکتری اشریشیا کلی سویه *XL1Blue* که از دانشگاه تهران تهیه شد، در محیط کشت LB در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت کشت داده شد و سپس در دستگاه سانتریفوژ لوله‌ای به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۶۰۰ سانتریفوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری به دست آمد. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر s به رسوب باکتری اضافه شد و پس از پیپتاژ کردن محتویات به یک ویال ۱/۵ انتقال داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در یخ قرارداده شد. سپس به مدت ۱ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار در دور g ۶۰۰۰ قرار داده شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از بافر s روی رسوب ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه در یخ قرار داده شد. ( در اثر شوک دمایی دیواره باکتری تضعیف شد). دوباره در دور g ۶۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژ شد، این بار ۲۰۰ میکرولیتر از بافر s روی رسوب ریخته شد و پیپتاژ شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن را به محلول Ligation اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه دیگر در یخ قرار داده شد. سپس ۹۰ ثانیه آن را در ۴۲ درجه سانتی گراد و دوباره ۱۰ دقیقه دیگر در یخ قرار داده شد. می توان آن ها را در حجم دلخواه ( معمولا ۷۵ میکرولیتر) در تیوبهای ۱/۵ میلی لیتری در پیچ دار مخصوص ذخیره و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد به صورت بلند مدت نگه داری کرد.

**۸-۳- نحوه ورود وکتور به باکتری‌های پذیرنده وکتور (ترانسفورمیشن)**

۴۰۰ میکرولیتر از محیط کشت ساخته شده بر داشته شد و در ویال ۱/۵ ریخته شد، مواد انتقال داده شده که در یخ قرار داشت به آن اضافه شد و پس از پیپتاژ کردن به مدت ۶۰-۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به محیط کشت آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین اضافه شد تا باکتری بتواند در محیط رشد کند و وکتوری که دریافت کرده را نگه دارد. سپس محتویات به مدت ۱ دقیقه در دور g۶۵۰ سانتریفوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب باکتری روی پلیت LB کشت داده شد و به مدت ۱ الی ۲ روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و در نهایت انجام کلونینگ تأیید شد.

**۹- تأیید صحت کلونینگ**

به منظور تأیید کلونینگ سه مرحله انجام شد.

**۹-۱- غربالگری کلنی‌های سفید از کلنی های آبی از رشد باکتری کلون شده بر روی محیط کشت LB**

برای این منظور نمونه هایی از باکتری کلون شده بر روی محیط کشت LB حاوی X-gal (20 mg/ml) به مقدار ۸۰ میکرولیتر، IPTG (100 mM) به مقدار ۸۰ میکرولیتر و آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به مقدار ۵۰ میکرولیتر کشت داده شدند. (وکتور کلونینگ در این روش PTG19-T دارای ژن *lacZ* بود، چون MCS وسط *lacZ* قرار داشت اگر قطعه‌ای وارد وکتور می شد ژن *lacZ* تخریب می گشت و آنزیم بتا گالاکتوزیداز غیرفعال می شد. در نتیجه باکتری نمی توانست از X-gal استفاده کند و کلنی های سفید در محیط کشت تشکیل می شد. به علاوه چون محیط دارای آمپی سیلین بود، کلنی‌هایی می توانستند در محیط رشد کنند که پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی سیلین را دریافت نموده بودند).

**۹-۲- انجام PCR با پرایمر ژن *speA***

یرای بررسی کلونینگ صحیح ژن مورد نظر در باکتری اشریشیا کلی، با واکنش PCR و پرایمرهای اختصاصی ژن مورد نظر، حضور ژن *speA* در باکتری پذیرنده بررسی شد.

### ۹-۳-تأیید ورود ژنوم باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز به داخل وکتور

برای این منظور واکنش PCR با پرایمر وکتور ( پرایمر M13) برای ژنوم باکتری میزبان انجام شد. سپس توالی محصول PCR جهت تایید ورود ژنوم باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز به داخل وکتور تعیین توالی گردید و با توالی ژنومی ژن *speA* در NCBI مقایسه شد ( Blast nucleotid).

## نتایج

### ۱- رشد باکتری

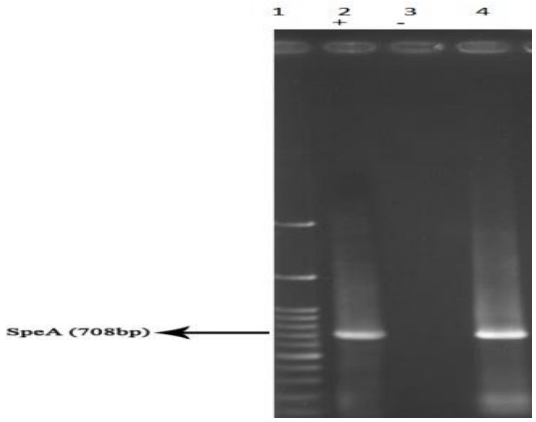
رشد سویه استاندارد استرپتوکوکوس پایوژنز با ATCC19615 لیوفلیزه، با کشت خطی بر روی محیط کشت بلاد آگار در مجاورت دی اکسید کربن مشاهده شد. سویه های رشد یافته دارای همولیز بودند و همولیز ایجاد شده بر روی بلاد آگار نشانه تأیید حضور آنها بود.

### ۲- تأیید نمونه DNA خالص استخراج شده

نسبت جذب نمونه DNA استخراج شده با طیف سنجی جذبی اشعه ماورا بنفش در ۲۶۰ نانومتر برابر ۱/۸ بود (که نشان دهنده نسبت غلظت DNA خالص است).

### ۳- نتایج الکتروفورز برای مشاهده محصول PCR

نتیجه الکتروفورز بر روی ژل آگارز جهت مشاهده محصول PCR انجام گرفت و تصویر باند حاصل از تکثیر ژن *speA* سویه استرپتوکوکوس پایوژنز ATCC19615 در شکل شماره ۲ آورده شده است.




**شکل شماره ۲- باند حاصل از تکثیر ژن speA سویه استرپتوکوکوس پایوژنز ATCC19615**
**از چپ به راست- خانه (۱): DNA مارکر (100 bp) - خانه (۲): کنترل مثبت : محصول PCR واجد DNA مورد نظر خانه- (۳): کنترل منفی : نمونه فاقد DNA مورد نظر- خانه (۴): محصولPCR : نمونه قطعه تکثیر شده از ژن speA (۷۰۸bp)**

### ۴- نتایج تأیید صحت مراحل کلونینگ

جهت تأیید کلونینگ پس از انجام مراحل Ligation و Transformation، باکتری اشریشیا کلی *XL1Blue* (پذیرنده وکتور PTG19-T ) از سه جنبه بررسی شد.

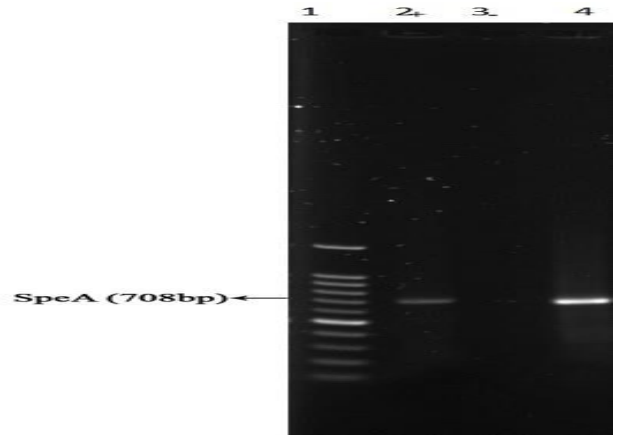
**۴-۱- نتایج کشت روی محیط LB**

باکتری روی پلیت محیط کشت LB آگار دارای X-gal ۸۰، IPTG و آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد و کلنی های سفید همراه کلنی‌های آبی تشکیل شد که نشان دهنده تخریب ژن *lacZ* و موفقیت کلون ژن مورد نظر بود.

به علاوه کلنی‌های رشد یافته در محیط نشانگر نمونه‌های گیرنده پلاسمید حاوی ژن مقاومت به آمپی‌سیلین بودند.

**۴-۲- نتایج تکثیر ژن *speA* با پرایمر اختصاصی خود ژن**

ژنوم باکتری اشریشیا کلی استخراج شد و واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن *speA* برای آن انجام گرفت (مطابق جداول شماره ۱، ۲ و ۳). پس از انجام الکتروفورز باند حاصل از محصول واکنش PCR با اندازه ژن مورد نظر (*speA*) یکسان مشاهده شد (شکل شماره ۳).

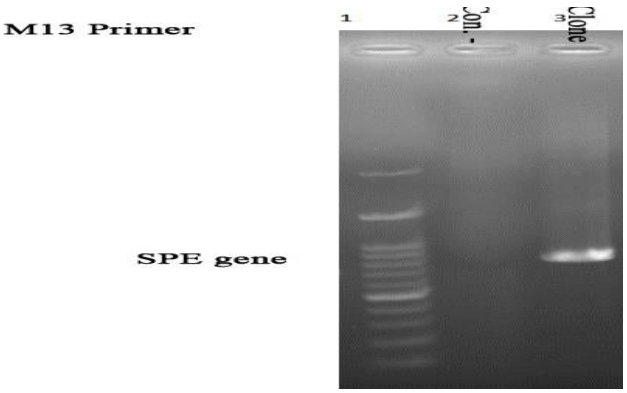



**شکل شماره ۳- باند حاصل از PCR با پرایمر اختصاصی خود ژن**

**از چپ به راست- خانه (۱): DNA مارکر (100bp)- خانه (۲): کنترل مثبت : محصول PCR حاصل از تکثیر ژن speA (۷۰۸bp) - خانه (۳): کنترل منفی: القا کلون فاقد وکتور نوترکیب PTG-19 – خانه (۴): نمونه کلون مثبت : القا کلون واجد وکتور PTG-19(۷۰۸bp).**

**۴-۳- نتایج PCR با پرایمرهای M13**

واکنش PCR با پرایمرهای M13 برای ژنوم باکتری اشریشیا کلی کلون شده، انجام گرفت. پس از الکتروفورز باند حاصل بیشتر از اندازه باند مربوط به ژن *speA* (۷۰۸bp) مشاهده شد. همچنین نتایج تعیین توالی قطعه کلون شده در وکتور با نرم افزار Mega و BLAST کردن توالی در سایت NCBI، نشان داد ژن مورد نظر با موفقیت کلون شده است. نتایج باند حاصل از محصول PCR با پرایمر M13 و نتایج BLAST توالی کلون شده با ژن *speA* استرپتوکوکوس پایوژنز، در NCBI، به ترتیب در شکل‌های شماره ۴ و ۵ آورده شده است.




**شکل شماره ۴- باند حاصل از PCR با پرایمر M13**

**از چپ به راست- خانه (۱): DNA مارکر (100bp) - خانه (۲): کنترل منفی کلون: القا کلون فاقد وکتور نوترکیب اشریشیا کلی XL1Blue - خانه(۳): نمونه مثبت کلون شده (القا کلون واجد وکتور نوترکیب اشریشیا کلی XL1Blue (750bp).**

*Streptococcus pyogenes strain ATCC 19615, complete genome*

Sequence ID: CP008926.1Length: 1844804Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 433509 to 434467GenBankGraphics Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score Expect Identities Gaps Strand

1605 bits (869) 0.0 932/961(97%) 9/961(0%) Plus/Plus

Query 1
ATTGTTAATAATAATGGTTAATTGTAATAACCTTTTTAAATCTAAAGGAGAACCCAGATA 60
||||||| ||||| |||| |||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct 433509
ATTGTTAGTAATATTGGTGAATTGTAATAACCTTTTTAAATCTAGAGGAGAACCCAGATA
433568

Query 61
TAAAATGGAGGAATATTAATGGAAAACAATAAAGAAGTATTGAAGAAAATGGTATTTTTT
120
|||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct 433569
TAAAATGGAGGAATATTAATGGAAAACAATAAAAAAGTATTGAAGAAAATGGTATTTTTT
433628

Query 121
GTTTTAATGAAATTTCTTGGACTAACAATCTTGCCAAAAGGTATTTGTTCAACAAGA-CC 179

```
            |||||| ||| |||||||||||||||||| | ||| ||||||||| ||||||||| ||
Sbjct  433629  GTTTTAGTGACATTTCTTGGACTAACAATCTCG-
CAAGAGGTATTTGCTCAACAAGACCC  433687

Query  180    CAAGCCCAGCCAATTACAAAGATCTAATTTAGTT-
AAAACCTTCAAAATATATATTTTCT  238
            | | || |||||| | || ||||||| ||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433688
CGATCCAAGCCAACTTCACAGATCTAGTTTAGTTAAAAACCTTCAAAATATATATTTTCT
433747

Query  239
TTATGAGGGTGACCCTGGTTACTCACGAGAATGTGAAATCTGTTGATCAACTTTTATCAC  298
            |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |
Sbjct  433748  TTATGAGGGTGACCCT-
GTTACTCACGAGAATGTGAAATCTGTTGATCAACTTTTATCTC  433806

Query  299
ACGATTTAATATATAATGTTTCAGGGCCAAATTATGATAAATTAAAAACTGAACTTAAGA
358
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433807
ACGATTTAATATATAATGTTTCAGGGCCAAATTATGATAAATTAAAAACTGAACTTAAGA
433866

Query  359
ACCAAGAGATGGCAACTTTATTTAAGGATAAAAACGTTGATATTTATGGTGTAGAATATT
418
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433867
ACCAAGAGATGGCAACTTTATTTAAGGATAAAAACGTTGATATTTATGGTGTAGAATATT
433926

Query  419
ACCATCTCTGTTATTTATGTGAAAATGCAGAAAGGAGTGCATGTCTCTACGGAGGGGTAA
478
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||
Sbjct  433927
ACCATCTCTGTTATTTATGTGAAAATGCAGAAAGGAGTGCATGTATCTACGGAGGGGTAA
433986

Query  479
CAAATCATGAAGGGAATCATTTAGAAATTCCTAAAAAGATAGTCGTTAAAGTATCAATCG
538
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  433987
CAAATCATGAAGGGAATCATTTAGAAATTCCTAAAAAGATAGTCGTTAAAGTATCAATCG
434046
```

Query 539 ATGGTATCCAAAGCCTATCATTTGATATTGAA-CAAAT-
AAAAAATGGTAACTGCTCAAG 596
||||||||||||||||||||||||||||||| ||||| ||||||||||||||||||
Sbjct 434047
ATGGTATCCAAAGCCTATCATTTGATATTGAAACAAATAAAAAAATGGTAACTGCTCAAG
434106

Query 597 AATTAG-
CTATACAGTTAGAAAATATCTTACAGATAATAAGCAACTATATACTAATGGAC 655
|||||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 434107
AATTAGACTATAAAGTTAGAAAATATCTTACAGATAATAAGCAACTATATACTAATGGAC
434166

Query 656
CTTCTAAATATGAAACTGGATATATAAAGTTCATACCTAAGAATAAAGAAAGTTTTTGGT
715
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 434167
CTTCTAAATATGAAACTGGATATATAAAGTTCATACCTAAGAATAAAGAAAGTTTTTGGT
434226

Query 716
TTGATTTTTTCCCTGAACCAGAATTTACTCAATCTAAATATCTTATGATATATAAAGATA 775
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 434227
TTGATTTTTTCCCTGAACCAGAATTTACTCAATCTAAATATCTTATGATATATAAAGATA
434286

Query 776
ATGAAACGCTTGACTCAAACACAAGCCAAATTGAAGTCTACCTAACAACCAAGTAAC-TT
834
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct 434287
ATGAAACGCTTGACTCAAACACAAGCCAAATTGAAGTCTACCTAACAACCAAGTAACTTT
434346

Query 835
TTGCTTTTGGCAACCTTACCTACTGCTGGATTTAGAAATTTTATTGCAATTCTTTTATTA 894
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 434347
TTGCTTTTGGCAACCTTACCTACTGCTGGATTTAGAAATTTTATTGCAATTCTTTTATTA
434406

Query 895 ATGTAAAAA-
CGCTCATTTGATGAGCGGTTTTGTCTTATCTAAAGGAGCTTTACCTCCTA 953
|||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||

Sbjct 434407
ATGTAAAAACCGCTCATTTGATGAGCGGTTTTGTCTTATCTAAAGGAGCTTTACCTCCTA
434466

Query 954 A 954
|
Sbjct 434467 A 434467

**شکل شماره ۵- نتایج همولوژی توالی قطعه کلون شده با توالی ژن speA استرپتوکوکوس پایوژنز**

## بحث

ابتلا به عفونت‌های استرپتوکوکوس‌های گروه A مانند استرپتوکوکوس پایوژنز در سرتاسر دنیا بسیار شایع می‌باشد و در افراد با سنین متفاوت دیده می‌شود. تلاش‌های بسیاری به منظور طراحی پروتئین نوترکیب علیه این عفونت‌ها صورت گرفته است که از بین آنها بیشترین تمرکز بر روی طراحی واکسن بر مبنای اگزوتوکسین A این باکتری بوده است. به علاوه استفاده از روش‌های سنتی تولید واکسن که در آنها از ارگانیسم عفونی به صورت کشته شده یا تضعیف شده استفاده می شود به دلیل وجود احتمال ابتلا به بیماری و مرگ مورد توجه قرار نمی‌گیرند. به همین دلیل امروزه تمرکز بیشتر تحقیقات تولید واکسن به طراحی واکسن‌های نوترکیبی می‌باشد که در آن ها از یک ژن ارگانیسم عفونی یا فراورده آن که خاصیت آنتی‌ژنیک دارد استفاده می شود، این گونه واکسن‌ها علاوه بر حذف خطر ابتلا به بیماری و مرگ، به دلیل تحریک پاسخ ایمنی سلولی و هومورال نیاز به واکسن‌های یادآوری نداشته و همچنین به نگه داری در یخچال مانند واکسن‌های سنتی نیاز ندارند و سبب ایجاد ایمنی کافی شده و از نظر اقتصادی نیز به صرفه می‌باشند (۳، ۴ و ۵). لذا در این پژوهش به بررسی کلونینگ اگزوتوکسین A استرپتوکوکوس پایوژنز پرداخته شده است که می‌تواند در تولید پروتئین نوترکیب و تحریک سیستم ایمنی، در نتیجه تولید آنتی‌بادی که توسط این پروتئین قابل ایجاد است نقش داشته باشد و با تولید این پروتئین نوترکیب می توان آن را به منظور تهیه واکسن استفاده نمود. زیرا تمرکز مطالعات جدید برای طراحی واکسن‌های نوترکیب صورت گرفته است و در این زمینه طی دهه‌های اخیر واکسن‌هایی بر اساس آنتی‌ژن‌های محافظ استرپتوکوکی، پروتئین‌های اتصالی فیبرونکتین، اگزوتوکسین A، B و C باکتری، استراز، سیستنیل پروتئاز، هیالورونیداز، C5a پپتیداز و اخیراً نیز نوکلئاز A طراحی شده‌اند (۸، ۹ و ۱۰). پروتئین اگزوتوکسین A به عنوان سوپر آنتی‌ژن در این باکتری شناخته می‌شود و می تواند با نقش آنتی‌ژنی سبب تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی گردد. بنابراین این ویژگی آن می‌تواند هدف تحقیقات جهت تولید واکسن برای بسیاری از باکتری‌های پاتوژن باشد. در حقیقت خنثی‌سازی اگزوتوکسین A ،خنثی‌سازی عفونت‌های استرپتوکوکی را به دنبال دارد و تولید و تخلیص اگزوتوکسین A استرپتوکوکوس پایوژنز و ارزیابی آن به عنوان کاندید واکسن با روش‌های متفاوت، گزارش شده است.

بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی کلونینگ اگزوتوکسین A استرپتوکوکوس پایوژنز می باشد که می تواند در تولید پروتئین نوترکیب به کار رود. به این منظور از تکنیک TA کلونینگ استفاده گردید که با حذف مرحله هضم آنزیمی سبب کلونینگ سریع تر و مؤثرتر قطعه ژن مورد نظر گردید.

به چند مورد از پژوهش‌های صورت گرفته در زمینه کلونینگ ژن‌های اگزوتوکسین و تولید پروتئین‌های نوترکیب متفاوت از استرپتوکوکوس پایوژنز و سایر باکتری‌ها به منظور طراحی واکسن نوکلئیک اسیدی علیه عفونت‌های باکتریایی اشاره می شود.

در پژوهشی که توسط یوریچ در سال ۲۰۰۸ در آزمایشگاه مولکولی موسسه تحقیقات پزشکی بیماری‌های عفونی ارتش مریلند، صورت گرفت ژن‌های اگزوتوکسین A و B استرپتوکوکوس پایوژنز شناسایی شد و ژنوم آن استخراج یافته و پس از تأیید کیفیت و اندازه گیری طول قطعه مورد نظر با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز، توسط PCR با آنزیم Taq DNA پلی مراز تکثیر یافته و در وکتور PET24b+ کلون گردید و در سلول بیانی اشریشیا کلی *BL21*بیان گردید. در نهایت تولید پروتئین‌های نوترکیب توسط تست وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفته و منجر به بروز واکنش ایمنی در موش و خرگوش گردید (۱۱). در پژوهش دیگری که در سال ۱۹۹۲ توسط ریچارد و همکارانش صورت گرفت، استرپتوکوکوس‌های گروه A به دست آمده از ۵۳ نمونه بیمار مبتلا به سندرم شوک سمی از نظر وجود ژن توکسین های اریتروژن A, B و C مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج به دست آمده نشان دادند که تنها ۵۸/۵ درصد از کل سویه ها دارای ژن های کدکننده توکسین اریتروژن می باشند که از بین آنها ۲۲/۶ درصد توکسین C، ۶۷/۷ درصد مجموع توکسین‌های A و B را کد می کنند و تقریبا هیچ رابطه مشخصی بین وقوع سندرم شوک سمی با توکسین اریتروژن B مشاهده نشد (۱۴). در مطالعه‌ای بیان بالای اگزوتوکسین A استرپتوکوکی در اشریشیا کلی مورد بررسی قرار گرفت، در این مطالعه نشان داده شد ژن *speA* که توکسین اریتروژن را در استرپتوکوکوس پایوژنز باکتریوفاژ T12 کد می‌کند در باکتری اشریشیا کلی تحت کنترل پروموتر T7 به میزان بالا بیان می گردد (۱۵). در پژوهشی که در سال ۲۰۰۱ توسط مک کورمیک و همکارانش در مرکز سلامت دانشگاه کلورادو صورت گرفت، پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین J استرپتوکوکوس پایوژنز تهیه گردید و اثر آن بر واکنش سیستم ایمنی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا توالی ژنوم که کدکننده اگزوتوکسین J بود شناسایی گردید سپس باکتری کشت داده شده و ژنوم آن استخراج گردید، ژن مورد نظر با تکنیک PCR توسط آنزیم Taq-DNA پلی مراز تکثیر داده شده و سپس کلونینگ توسط آنزیم های محدود کننده Nco 1 و BamH1 و سلول بیانی اشریشیا کلی سویه *XL1-Blue* صورت گرفت و پروتئین نوترکیب تولید شده سبب القای تب در موش و تحریک لنفوسیت های انسانی گردید که می توان از آن برای تولید آنتی بادی ضد توکسین J استفاده کرد (۱۳). درپژوهشی که توسط آذر مرادخانی و همکاران در سال ۱۳۹۱ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک صورت گرفت خواص آنتی ژنیک پروتئین نوترکیب هیالورونیداز A استرپتوکوکوس پایوژنز بیان شده در اشریشیا کلی مورد بررسی قرار گرفت. هیالورونیداز یک آنزیم موثر خارج سلولی می باشد که هیالورونیک اسید ماده زمینه ای مهم در بافت هم بند را تجزیه می کند. لذا هیالورونیداز در تهاجم میکروارگانیسم نقش موثری داشته و یکی از عوامل موثر در بیماری‌زایی این باکتری محسوب می شود. این آنزیم توسط میکروارگانیسم‌های گرم مثبت مختلفی شامل گونه‌های استرپتوکوکوس، استافیلوکوکوس، پروپیونی باکتریوم و استرپتومیسس تولید می‌شود (۱۶). اخیرا در پژوهشی که در سال ۲۰۱۵ توسط رادکلیف و همکارانش انجام شد، از نوکلئاز A استرپتوکوکوس پایوژنز به منظور تولید واکسن نوترکیب استفاده گردیده است. این مطالعه نشان داده که نوکلئاز A این باکتری یکی از عوامل بیماری زایی می باشد که در طول عفونت تولید می شود. حذف نوکلئاز A از باکتری منجر به کاهش بقای آن در خون انسان شده و همچنین مانع از ابتلا به عفونت در موش می‌شود (۴). در پاییز سال ۱۳۸۵ در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی توسط تیم پژوهشی دکتر سید محمد حسین مدرسی تحقیقی برای کلون سازی و بیان بالای پروتئین نوترکیب فعال با رویکرد تسهیل در فرایند خالص سازی استرپتوکیناز استرپتوکوکوس پایوژنز مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا پس از استخراج DNA ژن استرپتوکیناز از دو ناحیه با استفاده از پرایمرهای چپ و راست ضمن در نظر گرفتن یک جایگاه آنزیم برش دهنده معمول برای دو سر محصولات تکثیر شد و در حامل PGEX-4T-2 تحت پروموتور قوی *tac* و قابلیت بیان بالا کلون شد. پلاسمید

نوترکیب حاصل به وسیله عملیات هضم دو طرفه و تعیین توالی تایید و در اشریشیا کلی سویه *BL21* ترانسفورم شد. میزان بیان و فعالیت استرپتوکیناز نوترکیب مربوط به کلون واجد قطعه bp ۱۲۴۵ با استفاده از دانسیتومترلیزری و تست اختصاصی با سوبسترای S2251 در مقایسه با یک نمونه استرپتوکیناز خارجی مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان بیان پروتئین نوترکیب به بیش از ۴۵ درصد کل پروتئین های میزبان، موفقیت در کلون سازی را تأیید کرد (۱۷).

تولید استرپتوکیناز نوترکیب با بازدهی فراوان و قابلیت تخلیص آسان در مقیاس صنعتی، می تواند گامی موثر در جهت تولید ماده اولیه این داروی ژنریک در کشور باشد که سالانه بیش از یک میلیون دلار هزینه صرف خرید ۵۰ هزار آمپول مصرفی آن می‌شود. از فواید دیگر قابل دسترس بودن کلون حاصل، امکان مطالعات دیگر همچون استفاده از دیگر حامل‌ها، سلول های بیانی، جهش‌زایی، کاهش ایمونوژنیسیته و بهینه سازی شرایط تولید، فاکتورهای موثر بر بیان پروتئین مانند دما، نوع محیط کشت، غلظت القاء کننده، انواع القاء کننده، زمان القاء، مدت زمان القاء و پیدا کردن فاز لگاریتمی رشد باکتری در هنگام القاء است. امروزه تکنیک‌های مولکولی کلون کردن ژن های توکسین، روش های ژنتیکی مختلفی را برای سمیت زدایی فراهم می کنند. توکسوئید های نوترکیب علاوه بر اینکه توانایی جایگزینی توکسوئیدهای کلاسیک را دارند، با استفاده از مهندسی ژنتیک وارد باکتری‌های زنده ضعیف شده می شوند. چنین واکسن‌های زنده ای برای اکثر بیماری ها تنها با توزیع یک دوز مصونیت ایجاد می‌کند. بنابراین واکسیناسیون با پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A که در این مطالعه تنها بخش کلونینگ اگزوتوکسین A مورد بررسی قرار گرفته است می‌تواند منجر به ایجاد ایمنی قوی در برابر سویه های مختلف استرپتوکوکوس پایوژنز گردد. خاصیت آنتی‌ژنیک این پروتئین سبب تحریک آنتی بادی در سیستم ایمنی فرد شده و می‌تواند کاندید مناسبی برای تولید واکسن نوترکیب برای عفونت‌های استرپتوکوکوس های گروه A خصوصاً استرپتوکوکوس پایوژنز در انسان و سایر حیوانات باشد که شیوع بسیاری در سرتاسر جهان دارند و در زمینه پیشگیری از ابتلا به بیماری و کاهش هزینه های اقتصادی موثر باشد.

## نتیجه‌گیری

استرپتوکوکوس‌ها فاکتورهای بیماری‌زای متعددی دارند که نشان دهنده ماهیت بیماری‌زایی پیچیده آن است، هرکدام از این فاکتورهای بیماری‌زا در عفونت‌های استرپتوکوکی نقش مهمی دارند، پروتئین های ترشح شده از این باکتری نیز نقش مهمی در انتشار و آسیب بافت دارند. در میان توکسین‌های خارج سلولی استرپتوکوکوس پایوژنز اگزوتوکسین A نقش مهمی در بیماری زایی دارد. این توکسین ماده محلول پروتئینی است که باعث مهار پاسخ میزبان به عفونت می شود، همچنین خاصیت آنتی ژنیک داشته و وقتی مقدار کمتر از سایتوتوکسیک آن به کار رود علیه آن آنتی بادی اختصاصی ساخته می شود که بر اساس نتایج مطالعات این آنتی‌بادی بسیار محافظت کننده است. بنابراین به عنوان یک کو فاکتور مهم برای کاندید واکسن مورد توجه قرار دارد. بنابراین واکسیناسیون با اگزوتوکسین A که در این مطالعه تنها بخش کلونینگ اگزوتوکسین A مورد بررسی قرار گرفته است می‌تواند منجر به ایجاد ایمنی قوی در برابر سویه های مختلف استرپتوکوکوس پایوژنز گردد. به منظور تحریک سیستم ایمنی و افزایش تیتر آنتی بادی ضد استرپتوکوکوس پایوژنز در انسان و حیوانات، پروتئین نوترکیب اگزوتوکسین A استرپتوکوکوس پایوژنز می تواند بسیار مؤثر باشد. به خصوص که این واکسن می تواند علیه عفونت‌های استرپتوکوکوس‌های گروه A که شیوع بسیاری در سرتاسر جهان دارند، به کار رود و در تمامی مراکز و اماکن عمومی که احتمال ابتلا به این عفونت ها بالا می‌باشد، مانند بیمارستان‌ها و مراکز درمانی، مدارس، مهدکودک‌ها، خانه سالمندان مورد استفاده قرار گیرد و در زمینه پیشگیری و کنترل بیماری و مسائل بهداشتی، فرهنگی - اقتصادی جامعه مؤثر باشد. همچنین می تواند راه گشایی برای تحقیقات آینده در زمینه پیشرفت علم

بیوتکنولوژی در پزشکی و پزشکی شخصی[6] باشد که بتوان برای هر فرد واکسن مناسب با سیستم ایمنی خاص آن فرد طراحی گردد.

## سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم در دانشکده علوم زیستی و مسئولان محترم آزمایشگاه پاسارگارد به خصوص آقای دکتر امینی که در انجام کارهای آزمایشگاهی این تحقیق کمال همکاری را مبذول فرموده‌اند، سپاسگزاری و تشکر می‌گردد.

## منابع

1. Anderson EL, Cole JN, Olson J, Ryba B, Ghosh P, Nizet V. The fibrinogen-binding M1 protein reduces pharyngeal cell adherence and colonization phen otypes of M1T1 group A Streptococcus. The Journal of Biological Chemistry. 2014. **289**(6): 3539–3546.

2. Yamaguchi M, Terao Y. Kawabata S. Pleiotropic virulence factor- *Streptococcus pyogenes* fibronectin-binding proteins. Cellular Microbiology. 2013. **15**(4): 503–511.

3. Henningham A, Chiarot E, Gillen CM, Cole JN, Rohde M, Fulde M, Ramachandran V, Cork AJ, Hartas J, Magor G, Djordjevic SP, Cordwell SJ, Kobe B, Sriprakash KS, Nizet V, Chhatwal GS, Margarit IYR, Batzloff MR, Walker MJ. Conserved anchorless surface proteins as group a streptococcal vaccine Candidates. Journal of Molecular Medicine. 2012. **90**(10): 1197-1207.

4. Radcliff FJ, Fraser JD, Proft T. Vaccination with *Streptococcus pyogenes* nuclease A stimulates a high antibody response but no protective immunity in a mouse model of infection. Medical Microbiology and Immunology. 2015. **204**(2): 185-191.

5. Sheel M, Moreland NJ, Fraser JD, Carapetis J. Development of Group a streptococcal vaccine global health need. Expert Review of Vaccines. 2016. **15**(2): 227-238.

6. Eftekharivash L, Farajnia S, Najar Peerayeh Sh, Tanomand A. Optimization of expression and in vitro characteristics evaluation of *Pseudomonas aerugi nosa* recombinant exotoxin A (domains I and II). Journal of North Khorasan University. 2015. **7**(3): 495-507.

7. Smoot LM, McCormick JK, Smoot JC, Hoe NP, Strickland I, Cole RL, Barbian KD, Earhart CA, Ohlendorf DH, Veasy G, Hill HR, Leung DYM, Schlievert PM, Musser JM. Characterization of Two Novel Pyrogenic Toxin Superantigens Made by an Acute Rheumatic Fever Clone of *Streptococcus* py ogenes associated with Multiple Disease outbreaks. Infection and Immunity. 2002. **70**(12): 7095–7104.

8. Steer AC, Batzloff MR, Mulholland K, Carapetis JR. Group a Streptococcal vaccines facts versus fant asy. Current Opinion in Infectious Diseases. 2009. **22**(6): 544-552.

9. Wang N, Mattis DM, Sundberg EJ, Schlievert PM, Kranz DM. A Single Engineered Protein Therapeutic Agent Neutralizes Exotoxins from Both *Saphyococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. Clinical and Vaccine Immunology. 2010. **17**(11): 1781-1789.

10. Zhang Sh, Green NM, Sitkiewicz I, LeFebvre RB, Musser JM. Identification and Characterization of an Antigen I/II Family Protein Produced by Group A Streptococcus. Infection and Immunity. 2006. **74**(7): 4200-4213.

11. Ulric R. Vaccine based on a ubiquitous cysteinyl protease and streptococcal pyrogenic exotoxin A protects against *Streptococcus pyogenes* sepsis and toxic shock. Journal of Immune Based Therapies and Vaccines. 2008. **6**:1-8.

12. Hamada S, Kawabata S, Nakagawa I. Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group Streptococcus pyogenes. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2015. **91**(10):539-559.

[6] Personal Medical Science

13. McCormick JK, Pragman AA, Stolp JC, Leung DTM, Schlievert PM. Functional Characterization of Streptococcal Pyrogenic Exotoxin J, a Novel Supe rantigen. Infection and Immunity. 2001; 69(3): 1381–1388.

14. Reichardt W, Müller H. Erythrogenic toxins A, B and C occurrence of the genes and exotoxin form ation from clinical *Streptococcus pyogenes* strains associated with streptococcal toxic shock-like syndrome. FEMS microbiology letters. 1992. 100(1-3): 313-322.

15. Yamamoto M, Ferretti JJ. High level expression of *Streptococcus pyogenes* erythrogenic toxin A (SPE A) in *Escherichia coli* and its rapid purification by HPLC. FEMS Microbiology Letters. 1995.132: 209-2I3.

16. Moradkhani A, Abtahi H, Pakzad I, Karimi M. Antigenic characteristics of recombinant hyaluronidase A of *Streptococcus pyogenes* expressed in *E. coli*. Arak Medical University Journal. 2012. 14(55): 72-80.

17. Njadmoghadam MR, Modaresi M, Babashamsi M, Chamankhah M. Streptokinase: extraction, cloning and high expression of active recombinant protine with facility in purification. Journal of shahid beheshti medical science University. 2006. **30**(3): 245-252.