تحقیقی

دارای رتبه علمی-پژوهشی
ازکمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

کلونینگ ژن اتولیزین ماینور *استرپتوکوکوس پنومونیه*

رامینا محبوبی
کارشناس ارشد میکروب شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات زیست فناوری، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ، ایران
جلیل فلاح مهرآبادی
استادیار میکروب شناسی پزشکی، موسسه میکروب شناسی لیستر، تهران، ایران
محمدرضا پورمند
دانشیار میکروب شناسی پزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
راحیل مشهدی
کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی ملکولی، مرکز تحقیقات اورولوژی بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
آذر حدادی
دانشیار بیماری های عفونی، بخش داخلی و مرکز توسعه، بیمارستان سینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
نویسنده مسئول: محمدرضا پورمند
پست الکترونیک: mpourmand@tums.ac.ir
تلفن : ۸۸۹۵۴۹۱۰
آدرس: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دریافت: ۹۳/۱/۳۰
ویرایش پایانی: ۹۳/۶/۲۵
پذیرش: ۹۳/۳/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: *امروزه افزایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ناکارآمد بودن واکسن‌های موجود برای پیشگیری از عفونت‌های پنوموکوکی ضرورت بررسی آنتی‌ژن‌های جدید پروتئینی را مشخص می‌کند. به نظر می رسد اتولیزین ماینور استرپتوکوکوس پنومونیه دارای خواص آنتی ژنیک می باشد. در این مطالعه برای اولین بار ژن آن کلون گردید.*

روش بررسی: *پس از استخراج ژنوم سویه استاندارد استرپتوکوکوس پنومونیه (ATCC 49619) آغازگرهای اختصاصی به منظور تکثیر ژن اتولیزین ماینور با روش PCR طراحی شدند. قطعه ژن تکثیر شده پس از تخلیص به درون وکتور pET21a الحاق و با شوک حرارتی به درون سلول مستعد باکتریایی منتقل شد. وجود ژن در وکتور نوترکیب و عدم بروز جهش در آن با روش‌های هضم آنزیمی و تعیین توالی مورد بررسی قرار گرفت. این ژن در نهایت به روش بیوانفورماتیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.*

یافته‌ها: *قطعه ژن اتولیزین ماینور با موفقیت کلون شد و نتایج هضم آنزیمی نشان-دهنده جداسازی کامل این ژن از پلاسمید بود. بررسی‌های بیوانفورماتیک نشان داد که این ژن فاقد سیگنال پپتید بوده و پروتئینی به وزن ملکولی ۳۶/۴۴ کیلودالتون دارای ۳۱۸ اسیدآمینه را کد می کند.*

نتیجه‌گیری: *معرفی آنتی‌ژن‌های جدید نظیر اتولیزین ماینور و تعیین ویژگی های آنها مسیرهای بیش‌تری را در جهت پیش‌گیری و کنترل عفونت‌های ناشی از استرپتوکوکوس پنومونیه باز خواهد کرد.*

واژه های کلیدی: *استرپتوکوکوس پنومونیه، اتولیزین ماینور، کلونینگ*

آدرس مقاله
محبوبی ر، فلاح مهرآبادی ج، پورمند م، مشهدی ر، حدادی آ" کلونینگ ژن اتولیزین ماینور *استرپتوکوکوس پنومونیه*"
مجله علوم آزمایشگاهی، زمستان ۱۳۹۳، دوره هشتم (شماره ۵): ۱۰۴-۱۱۰

مقدمه

استرپتوکوکوس پنومونیه از باکتری‌های دستگاه تنفسی فوقانی انسان بوده و در نازوفارنکس کلونیزه می‌گردد. کلونیزاسیون پنوموکوک‌ها اغلب بدون علامت می‌باشد، اما گاهی منجر به بروز بیماری‌های تنفسی نظیر پنومونی اکتسابی از جامعه و یا بیماری‌های تهاجمی نظیر مننژیت و باکتریمی می‌گردد. افراد در معرض خطر بیماری‌های پنوموکوکی، کودکان خردسال به ویژه کودکان زیر دو سال، افراد مسن و افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی می‌باشند. در کشورهای در حال توسعه سالانه بیش از یک میلیون کودک زیر پنج سال به دلیل عفونت‌های پنوموکوکی جان خود را از دست می دهند. همین مساله تولید داروها و واکسن های مختلف برای درمان و پیشگیری از عفونت های پنوموکوکی را توجیه می کند(۱).

اولین واکسن علیه عفونت‌های پنوموکوکی، واکسن پلی-ساکاریدی ۱۴ ظرفیتی بود که در سال ۱۹۷۷ تولید شد و در دهه ۸۰ ظرفیت آن به ۲۳ سروتایپ افزایش یافت(۲). ناتوانی واکسن‌های پلی‌ساکاریدی در ایجاد مصونیت در کودکان، به ویژه کودکان زیر دو سال به دلیل ضعف پاسخ‌های آنتی‌بادی منجر به تولید واکسن‌های کونژوگه پروتئین-پلی ساکارید شد(۳). از جمله واکسن‌های کونژوگه، واکسن PCV7 می-باشد که اولین بار در سال ۲۰۰۰ میلادی وارد برنامه واکسیناسیون در ایالات متحده شد. این واکسن منجر به کاهش چشم‌گیری در عفونت‌های ناشی از سروتایپ‌های موجود در واکسن PCV7 گشت(۴). اما با تغییر الگوی سروتایپ‌های در گردش و افزایش سروتایپ‌های غیر PCV7، واکسن‌های کونژوگه با ظرفیت بالاتر بین سال‌های ۲۰۱۰-۲۰۰۹ با نام‌های PCV13 و PCV10 تولید شد(۶،۵). این دو واکسن در حال حاضر آخرین واکسن‌های قابل استفاده می-باشند که سروتایپ‌های بیشتری نسبت به PCV7 را تحت پوشش قرا می دهند(۷). با توجه به هزینه بالای طراحی واکسن‌های کونژوگه، عدم توانایی اتصال تمامی پلی-ساکاریدها به پروتئین‌های حامل و جایگزینی سروتایپ‌های غیر واکسن در جوامع مختلف، بررسی سایر آنتی‌ژن‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* ضروری گردید(۸). با توجه به مطالعات انجام شده بر روی پروتئین‌های سطحی، نشان داده شده که این عوامل می‌توانند کاندید مناسبی جهت تولید واکسن‌های موثرتر باشند. *استرپتوکوکوس پنومونیه* دارای سه گروه اصلی از پروتئین‌های سطحی که شامل پروتئین‌های متصل شونده به کولین (cbp)، پروتئین‌های دارای موتیف LPXTG و لیپوپروتئین‌های سطحی می‌باشد(۹). یکی از زیر مجموعه های پروتئین های متصل شونده به کولین اتولیزین ها می باشند. از نظر فیزیولوژی اتولیزین ها در جداسازی سلول ها، تقسیم سلول و لیز وابسته به آنتی بیوتیک ها نقش دارند(۱۱،۱۰). این آنزیم ها شامل ۴ گروه ان استیل مورامیداز، ان استیل گلوکزامیداز، ان استیل مورامیل ال آلانین آمیداز و اندوپپتیداز می باشند(۱۲). از نظر ساختاری اتولیزین ها حداقل از دو بخش تشکیل شده اند. انتهای آمینی آن ها دارای فعالیت کاتالیتیک و انتهای کربوکسیلی دارای خاصیت اتصالی به کولین های دیواره سلولی می باشد(۱۳). نقش اتولیزین ها در بیماری زایی پنوموکوک در مدل های حیوانی نشان داده شده است. در مطالعات مختلف مشخص شده است که اتولیزین ها در القا و ایجاد پورپورا و مراحل اولیه اندوفتالمیت ناشی از پنوموکوک نقش دارند(۱۵،۱۴). همچنین با ایجاد جهش در ژن های lytB و lytC مشخص شد که این اتولیزین ها در کلونیزاسیون و گسترش بیماری های التهابی به واسطه فرار از سیستم ایمنی ایفای نقش می کنند(۱۶). اعتقاد بر این است که آنزیم های اتولیزین با آزاد سازی اجزای دیواره سلولی پنوموکوکی منجر به التهاب می گردند(۱۷). در این مطالعه ژن اتولیزین ماینور که یکی از اعضای خانواده پروتئین های متصل شونده به کولین می‌باشد مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نقش سایر اعضای این خانواده پروتئینی، در بیماری-زایی *استرپتوکوکوس پنومونیه* و خاصیت ایمنی‌زایی آن‌ها، انتظار می‌رود که این ژن نیز در بیماریزایی دخیل باشد. علاوه بر این، وجود ژن اتولیزین ماینور در سویه‌های پنوموکوک، تحقیقات روی این آنتی‌ژن را به عنوان کاندیدای واکسن توجیه می‌کند. هدف از این مطالعه کلون کردن قطعه ژنی اتولیزین ماینور در پلاسمید pET 21a (+) می باشد که به

دنبال آن می تواند راه گشای تحقیقات بعدی در زمینه بررسی خواص آنتی ژنیک و طراحی واکسن موثری برای افراد در معرض خطر باشد.

روش بررسی

ژنوم سویه استاندارد *استرپتوکوکوس پنومونیه* (*ATCC:49619*) با استفاده از کیت (Roche، آلمان) استخراج شد. به منظور تکثیر ژن اتولیزین ماینور آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم افزار Gene Runner طراحی گردید (جدول۱). قطعه ژن مورد نظر در واکنشی به حجم ۱۰۰ میکرولیتر و با استفاده از Mastermix (سیناژن، ایران) به روش PCR تکثیر یافت. دستگاه ترموسایکلر (Sensoquest، آلمان) برای ۳۵ سیکل متوالی ۹۵ درجه سانتی‌گراد پنج دقیقه، ۹۸ درجه سانتی‌گراد ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه تنظیم شد. برای مشاهده محصول PCR در الکتروفورز از ژل آگارز ۰/۸ درصد (زیست فن آوران، ایران) و رنگ Power load (زیست فناوری کوثر، ایران) استفاده شد. برای کلونینگ ژن مورد نظر از وکتور pET 21a(+) استفاده شد. این پلاسمید از ۵۴۴۳ جفت باز تشکیل شده است و دارای پروموتور T7، ناحیه MCS، مناطق آغازگر pBR322 و f1 و ژن مقاومت به آمپی سیلین می باشد. تخلیص محصول PCR ژن اتولیزین ماینور از روی ژل با استفاده از کیت (Bioneer، کره جنوبی) انجام شد. محصول PCR و وکتور pET 21a (+) توسط دو آنزیم محدودالاثر *Nde*I و *Xho*I (Fermentase، کانادا) مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. این واکنش به مدت یک شبانه روز و در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد انجام گرفت. طی فرآیند متصل سازی قطعه ژن برش خورده توسط آنزیم T4 DNA Ligase (Takara، ژاپن) به وکتور برش خورده متصل شد. در این مرحله ترانسفورماسیون پلاسمید نوترکیب به درون سلول باکتریایی مستعد *E.coli DH5α* منتقل شد. این انتقال به روش شوک حرارتی انجام گرفت. ابتدا باکتری مستعد همراه با پلاسمید نوترکیب به مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه بر روی یخ و سپس بلافاصله به مدت دو دقیقه در بن ماری با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. ویال حاوی باکتری پس از افزودن یک میلی لیتر آبگوشت لوریا برتانی (Merck، آلمان) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ محلول باکتری در دور RPM ۵۰۰۰ به مدت پنج دقیقه، رسوب باکتری در محیط آگار لوریا برتانی (Merck، آلمان) حاوی مقادیر مناسب از آمپی‌سیلین (۱۰۰mg/ml)کشت و به مدت یک شبانه روز در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. یکی از کلنی‌های رشد یافته در محیط جامد را برداشته و در آبگوشت لوریا برتانی دارای آمپی‌سیلین تلقیح شد. لوله‌های حاوی باکتری به مدت یک شبانه روز در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۵۰RPM قرار گرفت.

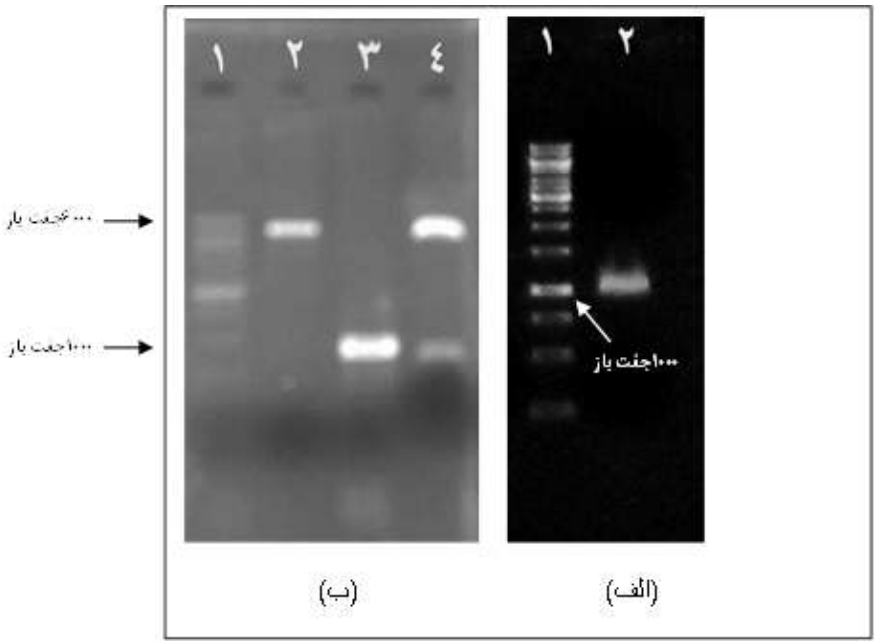
پس از تکثیر پلاسمید نوترکیب و استخراج آن با استفاده از کیت (Qiagene، آلمان)، جهت تایید وجود ژن اتولیزین ماینور این پلاسمید با استفاده از آنزیم‌های *Nde*I و *Xho*I برش داده شد. همچنین جهت بررسی عدم وجود جهش و تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد. نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم افزار **Gene** Runner مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها

نتایج حاصل از واکنش PCR (شکل ۱) نشان داد که طول ژن اتولیزین ماینور ۹۵۷ جفت باز می باشد. پس از هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب با آنزیم‌های NdeI و XhoI، نتیجه این واکنش روی ژل آگارز بررسی شد. به این ترتیب دو باند بر روی ژل آگارز مشاهده شد که یک باند مربوط به پلاسمید pET 21a (+) و باند دیگر مربوط به قطعه ژن مورد نظر بود. تعیین توالی ژن اتولیزین ماینور نشان داد که این ژن به طور صحیح و بدون وجود جهش در داخل وکتور الحاق شده است. بررسی شباهت ژن اتولیزین ماینور با سایر ژن‌های موجود در بانک ژنی نشان داد که این ژن در تمام سویه‌های *استرپتوکوکوس پنومونیه* حفاظت شده می باشد. همچنین با بررسی‌های نرم افزاری مشخص شد که این ژن یک پروتئین به وزن ملکولی ۳۶/۴۴ کیلو دالتون را کد می‌کند که احتمالا دارای عملکرد اتولیزینی می‌باشد. این پروتئین فاقد سیگنال پپتید بوده و از پروتئین‌های سطحی این باکتری محسوب می شود.

جدول۱- توالی پرایمرهای اتولیزین ماینور استرپتوکوکوس پنومونیه

پرایمر جلوبر	GCGCGCCATATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAGAA
پرایمر معکوس	GCGCGCCTCGAG TTTTACTGTAATCAAGCCATCTG



شکل ۱- الف) چاهک ۱ مارکر وزن مولکولی ۱ کیلو باز، چاهک ۲ محصول PCR ژن spr1754 ، ب) چاهک ۱ مارکر وزن مولکولی ۱ کیلوباز، چاهک ۲ پلاسمید pET21a برش داده شده توسط آنزیمهای Xho1 وNde1 ، چاهک ۳ محصول PCR ژن spr1754 برش داده شده توسط آنزیمهای Xho1 وNde1 ، چاهک ٤ پلاسمید نوترکیب pET21a برش داده شده توسط آنزیمهای Xho1 و Nde1

بحث

هزینه بالای تولید واکسن‌های کونژوگه و پوشش سروتایپی پایین از محدودیت‌های استفاده از این واکسن‌ها می باشند(۱۸،۱۹). امروزه تعداد زیادی از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی در سراسر دنیا آنتی‌ژن‌های پروتئینی پنوموکوک و توانایی آن‌ها در ایجاد مصونیت علیه بیماری‌های ناشی از این عوامل بیماری زا را مورد مطالعه قرار داده‌اند(۲۰). در سال ۲۰۰۶، مطالعه Whalan و همکاران نشان داد که پروتئین‌های PiaA و PiuA/*استرپتوکوکوس پنومونیه* توانایی تحریک تولید آنتی بادی در سرم و ترشحات تنفسی موش را دارند، بنابراین می‌توانند کاندیدای مناسبی برای تولید واکسن‌های موثرتر باشند(۲۱). همچنین در مطالعه Moreno و همکاران در سال ۲۰۱۰ مشخص شد که پروتئین PspA توانایی ایجاد مصونیت علیه عفونت‌های پنوموکوکی را دارد(۲۲). در سال ۲۰۱۲ Cardaci و همکاران در مطالعه خود بر روی پروتئین Spr1875 نشان دادند که این پروتئین دارای خاصیت ایمونوژنیک می باشد(۲۳). در مطالعه Lock و همکاران مقایسه ایمنی زایی پنومولایزین و اتولیزین مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مشخص شد که ایمنی زایی این دو پروتئین قابل دفاع است ولی استفاده از هر دو پروتئین در مدل های حیوانی فاقد اثر سینرژیسم می باشد(۲۴). در مطالعه Kaur و همکاران در سال ۲۰۱۱ پاسخ آنتی بادی سرم به پروتئین LytB و سایر پروتئین های پنوموکوک ارزیابی گردید. در این مطالعه مشخص شد پاسخ آنتی بادی نسبت به این پروتئین ها در کودکان مبتلا به اوتیت میانی نسبت به کودکان مبتلا به بیماری غیر از اوتیت میانی بیشتر می باشد. همچنین در این مطالعه مشخص شد که این پروتئین ها باعث تحریک مناسب تولید آنتی بادی می گردد، بنابراین می توان از آن ها به عنوان کاندید واکسن پنوموکوکی در کودکان مبتلا به عفونت

گوش میانی پنوموکوکی استفاده کرد(۲۵). Yuan و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطالعه ای بر روی خاصیت ایمنی زایی LytA در مدل موشی انجام دادند. در این مطالعه ژن کامل LytA کد کننده اتولیزین ساب کلون گشت. مطالعات بیوانفورماتیک نشان داد که توالی این ژن در تمام سویه های مورد استفاده در این مطالعه حفاظت بالایی داشت. این مطالعه خاصیت مصونیت زایی پروتئین LytA را نیز نشان داد که منجر به تحریک تولید آنتی بادی های IgG، IgA و IgA ترشحی شد(۲۶).

ژن اتولیزین فرعی یکی از پروتئین‌های سطحی پنوموکوک می‌باشد که در خانواده پروتئین های متصل شونده به کولین قرار می‌گیرد. این پروتئین برای اولین بار در سال ۲۰۱۰ در مجموعه‌ای از پروتئین‌های سطحی *استرپتوکوکوس پنومونیه* معرفی گردید(۲۷). تاکنون مطالعه ای بر روی ژن spr1754 در دنیا انجام نگرفته است و در این مطالعه برای اولین بار این ژن با موفقیت کلون شد. انتخاب این ژن بر اساس مطالعاتی بود که قبلا بر روی خاصیت آنتی ژنی سایر اعضای این خانواده پروتئینی و همچنین نقش آن‌ها در ویرولانس *استرپتوکوکوس* پنومونیه انجام گرفته بود. با در دست داشتن این وکتور نوترکیب می توان به پروتئین کد شونده توسط آن دست یافت و پس از تخلیص آن می‌توان به بررسی خواص ایمونولوژیک این پروتئین پرداخت. با بیان این پروتئین در مطالعات آینده همچنین می‌توان واکنش آن با آنتی‌بادی های سرم، خاصیت چسبندگی آن به پروتئین‌های پلاسما و نقش آن در بیماری زایی را مورد بررسی قرار داد.

نتیجه گیری

موفقیت در کلونینگ و حفاظت شده بودن ژن اتولیزین مایتور *استرپتوکوکوس پنومونیه* فرصت جدیدی جهت مطالعات آینده پیرامون خواص آنتی ژنیک آن فراهم می سازد.

تشکر و قدردانی

از زحمات و همکاری های صمیمانه سرکار خانم پردیس سعیدی و کارکنان آزمایشگاه های گروه میکروب شناسی دانشکده بهداشت کمال تشکر و سپاس گذاری را داریم.

References

1. Cartwright K. *Pneumococcal disease in western Europe: burden of disease, antibiotic resistance and management.* Eur J Pediatr. 2002; 161(4): 188-95.

2. French N. *Use of pneumococcal polysaccharide vaccines: no simple answers*. J Infect. 2003; 46(2): 78-86.

3. Selman S, Hayes D, Perin LA, Hayes WS. *Pneumococcal conjugate vaccine for young children.* Manag Care. 2000; 9(9): 49-52.

4. *HHS-CDC news: Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease--US, 1998-2003*. Ann Pharmacother. 2005; 39(11): 1967-8.

5. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. *Recommendations for the prevention of Streptococcus pneumoniae infections in infants and children: use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) and pneumococcal polysaccharide vaccine (PPSV23)*. Pediatrics. 2010; 126(1): 186-90.

6. Weil-Olivier C, van der Linden M, de Schutter I, Dagan R, Mantovani L. *Prevention of pneumococcal diseases in the post-seven valent vaccine era: A European perspective*. BMC Infect Dis. 2012; 12(1): 1-12.

7. Briles DE, Hollingshead S, Brooks-Walter A, Nabors GS, Ferguson L, Schilling M, et al. *The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection*. Vaccine. 2000; 18(16): 1707-11.

8. Bischof A, Brumshagen C, Ding N, Kirchhof G, Briles DE, Gessner JE, et al. *Basophil expansion protects against invasive pneumococcal disease in mice*. J Infect Dis. 2014; 210(1): 14-24.

9. Schneewind O1, Model P, Fischetti VA. Sorting of protein A to the taphylococcal cell wall. Cell 1992; 70(2): 267-281.

10. Whatmore AM, Dowson CG. *The autolysin-encoding gene (lytA) of Streptococcus pneumoniae displays restricted allelic variation despite localized recombination events with genes of pneumococcal bacteriophage encoding cell wall lytic enzymes*. Infect Immun. 1999; 67(9): 4551-4556.

11. Ju CX, Gu HW, Lu CP. *Characterization and functional analysis of atl, a novel gene encoding autolysin in Streptococcus suis.* J Bacteriol. 2012; 194(6): 1464-1473.

12. Atilano ML, Pereira PM, Vaz F, Catalão MJ, Reed P, Grilo IR, et al. *Bacterial autolysins trim cell surface peptidoglycan to prevent detection by the Drosophila innate immune system*. Elife. 2014; 3:e02277.

13. Diaz E, Lopez R, Garcia JL. *Chimeric phage-bacterial enzymes: a clue to the modular evolution of genes.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1990; 87(20): 8125-8129.

14. Chetty C, Kreger A. *Role of autolysin in generating the pneumococcal purpura-producing principle*. Infect Immun. 1981; 31(1): 339-344.

15. Ng EW, Costa JR, Samiy N, Ruoff KL, Connolly E, Cousins FV, et al. *Contribution of pneumolysin and autolysin to the pathogenesis of experimental pneumococcal endophthalmitis*. Retina. 2002; 22(5): 622-632.

16. Ramos-Sevillano E, Rodríguez-Sosa C, Díez-Martínez R, Giménez MJ, Olmedillas E, García P, et al. *Macrolides and beta-lactam antibiotics enhance C3b deposition on the surface of multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae strains by a LytA autolysin-dependent mechanism*. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(11): 5534-5540.

17. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A. *The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall*. J Infect Dis. 1985; 151(5): 859-868.

18. Douce G, Ross K, Cowan G, Ma J, Mitchell TJ. *Novel mucosal vaccines generated by genetic conjugation of heterologous proteins to pneumolysin (PLY) from Streptococcus pneumoniae*. Vaccine. 2010; 28(18): 3231-7.

19. Briles DE, Hollingshead SK, Nabors GS, Paton JC, Brooks-Walter A. *The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by Streptococcus pneumoniae*. Vaccine. 2000; 19 (Suppl 1): S87-95.

20. Brown JS, Ogunniyi AD, Woodrow MC, Holden DW, Paton JC. *Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic Streptococcus pneumoniae infection.* Infection and immunity. 2001; 69(11): 6702-6.

21. Whalan RH1, Funnell SG, Bowler LD, Hudson MJ, Robinson A, Dowson CG. *PiuA and PiaA, iron uptake lipoproteins of Streptococcus pneumoniae, elicit serotype independent antibody responses following human pneumococcal septicaemia*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005; 43(1): 73-80.

22. Moreno AT, Oliveira ML, Ferreira DM, Ho PL, Darrieux M, Leite LC, et al. *Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection.* Clin Vaccine Immunol. 2010; 17(3): 439-46.

23. Cardaci A, Papasergi S, Midiri A, Mancuso G, Domina M, Cariccio VL, et al. *Protective activity of Streptococcus pneumoniae Spr1875 protein fragments identified using a phage displayed genomic library*. PLoS One. 2012; 7(5): e36588.

24. Lock RA, Hansman D, Paton JC. *Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by Streptococcus pneumoniae.* Microb Pathog. 1992; 12(2): 137-143.

25. Kaur R, Casey JR, Pichichero ME. *Serum antibody response to five Streptococcus pneumoniae proteins during acute otitis media in otitis-prone and non-otitis-prone children*. Pediatr Infect Dis J. 2011; 30(8): 645-650.

26. Yuan ZQ, Lv ZY, Gan HQ, Xian M, Zhang KX, Mai JY, et al. *Intranasal immunization with autolysin (LytA) in mice model induced protection against five prevalent Streptococcus pneumoniae serotypes in China*. Immunol Res. 2011; 51(1): 108-115.

27. Frolet C, Beniazza M, Roux L, Gallet B, Noirclerc-Savoye M, Vernet T, et al. *New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins.* BMC Microbiology. 2010; 10(1): 190.

Cloning of Minor Autolysin of Streptococcus Pneumoniae

Mahboobi, R. (MSc)
MSc of Microbiology, Biotechnology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Fallah Mehrabadi, J. (PhD)
Assistant Professor of Medical Microbiology, Lister Microbiology Institute, Tehran, Iran

Pourmand, MR. (PhD)
Associate Professor of Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Mashhadi, R. (MSc)
MSC of Molecular Biology, Urology Research Center, Sina Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Haddadi, A. (MD)
Associate Professor of Infectious Disease, Department of Internal Medicine and Research Development Center, Sina Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objective: Increased antibiotic resistant strains and inadequacy of current vaccines against pneumococcal infections necessitate the study of novel protein antigens. It seems that minor autolysin of *Streptococcus pneumoniae* may have antigenicity. Thus, we aimed at cloning its gene for the first time.

Material and Methods: After DNA extraction of *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), Specific primers were designed for amplifying minor autolysin gene fragment, using PCR. The purified gene fragment was inserted into pET21a vector and was transformed into bacterial competent cells by heat shock technique. The presence of gene and absence of mutation in the recombinant vector were checked out with sequencing and enzymatic digestion methods. The gene sequence was finally analyzed by bioinformatic tools.

Results: The gene of minor autolysin was cloned successfully and the result of enzymatic digestion was the indication of complete isolation of this gen from plasmid. . Bioinformatics studies revealed that the mature protein was lacking signal peptide and the gene encoded 318 amino acids with a molecular weight of 36.4 kDa.

Conclusion: The presentation and characterization of novel antigens such as minor autolysin could help us with finding new approaches for preventing and controlling pneumococcal infection.

Keywords: *Streptococcus Pneumoniae*, Minor Autolysin, Cloning

Corresponding Author:
Pourmand, MR.

Email: mpourmand@tums.ac.ir

Received: 19 Apr 2014
Revised: 19 May 2014
Accepted: 21 May 2014

This paper should be cited as: Mahboobi R, Fallah Mehrabadi J, Pourmand MR, Mashhadi R, Haddadi A. [Cloning of Minor Autolysin of Streptococcus Pneumoniae]. mljgoums. 2015; 8(5): 104-110[Article in Persian]