Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2024; Vol. 48; No. 2

Molecular Study and Cloning of the *dt* Gene of *Corynebacterium* in Susceptible Cells in Order to Prepare a Vaccine

Samaneh Sadeghi[1], Nooshin Khandan Dezfully[2]*, Kumars Amini[3]

1. Department of Cellular and Molecular Biology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran.
2. Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran.
3. Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Received: June 30, 2023; Accepted: June 30, 2024

Abstract

Background and Aim: *Corynebacterium diphtheriae* is an aerobic, gram-positive, non- sporulating bacterium. Diphtheria toxin (*dt*) is a highly toxic protein and produced as a result of bacterial infection with a special corynephage that carries tox. The aim of the present study was to clone the *dt* gene of Corynebacterium in susceptible *E.coli XL1blue* cell in order to produce a recombinant protein and use this protein in subsequent research in 2022 at Pasargård Research Institute.

Methods: In this Cross- sectional study, a DNA sample of *Corynebacterium diphtheria* vaccinal strain PW8 Sub-strain 2000CN was prepared from Razi Institute in Tehran. To identify the *dt* gene, the DNA bacterial strain was amplified using specific primers in the polymerase chain reaction (PCR) method. Using the TA- cloning kit, the *dt* gene was cloned in the susceptible *E.coli* XL1blue cell. The phylogeny tree for the bacterial strain was performed by DNA sequencing of the 16 srRNA gene region using clustalX and Mega5 software.

Results: The DNA of *Corynebacterium diphtheria* carried the *dt* gene. TA- cloning of the *dt* gene was confirmed by the Real- Time PCR method, DNA sequencing of the PCR product, the presence of white- blue colonies, and amplification with an M13 primer. The result of DNA sequencing of the 16 srRNA gene region was confirmed as *Corynebacterium diphtheria*.

Conclusion: In this study, the *dt* gene was cloned in the *E.coli* XL1blue vector and then confirmed, and it can be considered as a powerful antigen for the preparation of the recombinant protein tool, as well as for stimulating the immune system. This gene can be used in future studies.

Keywords: Diphtheria; *Corynebacterium*; *dt* gene; Cloning

Please cite this article as: Sadeghi S, Khandan Dezfully N, Amini K. Molecular Study and Cloning of the *dt* Gene of *Corynebacterium* in Susceptible Cells in Order to Prepare a Vaccine. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(2):27-36.

*Corresponding Author: Nooshin Khan Dandezfully; **Email:** nooshinkhandan22@gmail.com
Department of Microbiology, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-09]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی-پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۸، شماره ۲، سال ۱۴۰۳ شمسی، صفحات ۲۷ تا ۳۶

مطالعه مولکولی و کلونینگ ژن *dt* کورینه باکتریوم در سلول مستعد برای تهیه واکسن

سمانه صادقی[۱]، نوشین خندان دزفولی[۲*]، کیومرث امینی[۳]

۱- گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران.
۲- گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران.
۳- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۱۰

چکیده

سابقه و هدف: *کورینه باکتریوم دیفتریه* باکتری هوازی، گرم مثبت و غیر اسپورزا است. توکسین دیفتری (*dt*)، پروتئینی با سمیت بسیار بالا بوده و در اثر آلودگی باکتری به کورینه فاژ خاصی که حامل *tox* است، تولید می‌شود. هدف از مطالعه حاضر، کلونینگ ژن *dt کورینه باکتریوم* در سلول مستعد *E.coli* XL1blue برای تولید پروتئین نوترکیب و استفاده از این پروتئین در تحقیق‌های بعدی در سال ۱۴۰۱ در مؤسسه پژوهشی پاسارگارد بود.

روش کار: در این مطالعه مقطعی، یک نمونه DNA سویه واکسینال کورینه باکتریوم دیفتریه PW۸ تحت سویه CN۲۰۰۰ از موسسه رازی تهران تهیه شد. برای شناسایی ژن *dt*، DNA سویه باکتری با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در روش واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (PCR) تکثیر یافت. با استفاده از کیت TA-کلونینگ ژن مذکور در سلول مستعد *E.coli XL1blue* انجام شد. رسم درخت فیلوژنی با استفاده از تعیین توالی ناحیه ژنی *srRNA* ۱۶ برای سویه باکتری استفاده شده با نرم‌افزار clustalX و Mega5 انجام شد.

یافته‌ها: DNA سویه *کورینه باکتریوم دیفتری* حامل ژن *dt* بودند. انجام TA-کلونینگ ژن *dt* با روش‌های Real Time PCR، تعیین توالی محصول PCR، حضور کلنی‌های سفید آبی و تکثیر با پرایمر M13 تأیید شد. نتیجه تعیین توالی ناحیه ژنی *SrRNA* ۱۶ تأییدکننده *کورینه باکتریوم دیفتری* بود.

نتیجه‌گیری: در این بررسی ژن *dt* در وکتور *E.coli* XL1blue کلون و سپس تأیید شد و در جهت آماده‌سازی برای ابزار پروتئین نوترکیب و همچنین به عنوان یک آنتی‌ژن قوی در تحریک سیستم ایمنی می‌تواند در نظر گرفته شود. این ژن می‌تواند در مطالعه‌های بعدی استفاده شود.

واژگان کلیدی: دیفتری؛ *کورینه باکتریوم*؛ ژن *dt*؛ کلونینگ

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Sadeghi S, Khandan Dezfully N, Amini K. Molecular Study and Cloning of the *dt* Gene of *Corynebacterium* in Susceptible Cells in Order to Prepare a Vaccine. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(2):27-36.

*نویسنده مسئول مکاتبات: نوشین خندان دزفولی؛ آدرس پست الکترونیکی: nooshinkhandan22@gmail.com
گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-09]

مقدمه

دیفتری، بیماری بسیار عفونت‌زا، توسط *کورینه باکتریوم دیفتریه* باکتری هوازی، گرم مثبت و غیر اسپورزا، به وجود می‌آید (۱). راه انتقال بیماری از طریق استنشاق ذرات معلق در هوا است. نسبت مرگ و میر این بیماری، بین ۵ تا ۱۰ درصد بوده و در کودکان زیر پنج سال و افراد بزرگسال، این نسبت ممکن است به بیش از ۲۰ درصد برسد، شیوع بیماری اگرچه بسیار نادر، اما هنوز هم در سراسر دنیا، حتی در کشورهای پیشرفته رخ می‌دهد (۲). بیماری دستگاه تنفسی فوقانی با علایمی مانند: گلو درد، تب ضعیف و یک غشای بهم چسبیده (پسودو ممبران یا غشای کاذب) در لوزه‌های گلو و حفره‌های بینی، تظاهر می‌کند. عوارض توکسین دیفتری شامل میوکاردیت (التهاب عضله قلب)، پلی نوریت (التهاب چندین عصب) و دیگر آثار سمی سیستمیک را ایجاد می‌کند (۳). *توکسین دیفتری* (*dt*)، پروتئینی با سمیت بسیار بالا بوده و در اثر آلودگی باکتری به فاژ خاصی که واجد *tox* است، تولید می‌شود (۴). بعد از مجاورت توکسین با تریپسین و عوامل احیاکننده، توکسین (۶۲ کیلو دالتونی) به دو قطعه پلی پپتیدی گسسته می شود، که شامل قطعه A با وزن مولکولی ۲۱/۱۴۵ کیلو دالتون و قطعه B با وزن مولکولی ۳۸ کیلو دالتون هستند. قطعهA ، ناحیه انتهای آمینی مولکول توکسین بوده که خاصیت آنزیمی داشته و عمل ADP-ریبوزیلاسیون (ADP-) ribosilation فاکتور طویل‌کننده زنجیره ۲- (EF-2) را تسریع می‌کند که به موجب آن سنتز پروتئین در این سلول‌های یوکاریوتی مهار می‌شود و در نهایت سلول از بین می‌رود (۵). قطعه B، قسمت انتهایی کربوکسیل مولکول توکسین است که برای اتصال به رسپتور مخصوص در غشاء پلاسمایی سلول‌های یوکاریوتی حساس الزامی است. این قطعه خود از دو حوزه تاشونده می پروتئینی مجزا تشکیل یافته است، حوزه R که به رسپتور واقع در سطح سلول متصل می‌شود و حوزه T که توان ورود به داخل غشاها را داشته و در انتقال غیرمستقیم قطعه A از عرض غشاء نقش دارد (۶). اتصال توکسین دیفتری به رسپتورش به روش اندوسیتوزی، توسط اندوسیتوز وابسته به کلاترین انجام می‌شود. pH اسیدی در اندوزوم‌ها سبب تغییر ساختاری توکسین شده و دوبل هلیکس در دومین T وارد غشاء اندوزوم می‌شود. ساختار سنجاق سری (hairpin) وارد شده به غشاء به قطعه A کمک می‌کند تا از میان غشاء اندوزوم عبور کند و به دنبال کم شدن پیوندهای دی سولفیدی قطعه A در سیتوزول رها می‌شود (۶). بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، ردیابی مولکولی وکلونینگ ژن *dt کورینه باکتریوم* در سلول مستعد *E.coli* XL1blue برای تولید پروتئین نوترکیب و استفاده از این پروتئین در تحقیق‌های بعدی در سال ۱۴۰۱ در موسسه پژوهشی پاسارگارد بود.

روش کار

تهیه DNA باکتری

در این مطالعه مقطعی در سال ۱۴۰۱ در موسسه پژوهشی پاسارگارد، یک نمونه DNA سویه واکسینال *کورینه باکتریوم دیفتریه* PW۸ تحت سویه CN ۲۰۰۰ به صورت هدیه از موسسه رازی تهیه شد. پلاسمید pTG19-T (وکتور T/A کلونینگ) از (ویوانتیس، مالزی) تهیه شد.

واکنش PCR

برای شناسایی ژن توکسین دیفتری (*dt*)، بر اساس انتهای5´ و3´ توالی آن یک جفت پرایمر: Forward:5'-GGGACTACAACGCAACAAGAA -'3 و Reverse:5'-AGAAGAAAAGACAATGTTTCGC -'3 (شرکت سیناکلون، ایران) طراحی شد. پرایمر استفاده شده در این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner (نسخه ۶/۰/۲۸) از ref-seq سویه کورینه باکتریوم دیفتریه با عدد ثبت شده OY750578.1 طراحی شد. برای انجام واکنش PCR (دستگاه ترموسایکلر، آلمان، Gradient Masterrcycler Eppendorf) برای تکثیر ژن توکسین دیفتری (*dt*)، حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر بوده است که شامل: ۱ میکرولیتر DNA باکتری (به عنوان الگو)، ۱۰پیکو مول از هر پرایمر، ۱/۵میلی مولار MgCl2، ۰/۲ میلی مولارdNTP، بافر 1x PCR ، ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase، آب دیونیزه به میزان نصف حجم هر واکنش بود. برنامه حرارتی استفاده شده شامل: ۹۵ درجه

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-09]

سانتی‌گراد ۳ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه دمایی به ترتیب ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۵ دقیقه تنظیم شد. سپس محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد، الکتروفورز (دستگاه الکتروفورز مدل BIO-RAD SUB CELL GT) و با رنگ سایبر گرین رنگ‌آمیزی و با استفاده از نور UV (رویان ایران) ارزیابی و محصول PCR با تعیین توالی یابی تأیید شد (۷، ۸).

کلون کردن ژن *dt*

کلونینگ محصول PCR با استفاده از آنزیم DNA 4TLigase با روش TA- Cloning انجام شد. در این روش از یک وکتور خطی PTG19-T با انتهای ´۳ باز تیمین استفاده شد. محتوای واکنش به سلول *E.coli XL1blue* انتقال یافت. کیت PCR TA- Cloning از شرکت سیناکلون (ایران) تهیه شد. وکتور-PTG19 T به عنوان ناقل، BamH1 به عنوان آنزیم برش دهنده و سویه *E.Coli* XL1blue به عنوان میزبان استفاده شد. غربالگری ورود وکتور به میزبان توسط محیط دارای آمپی‌سیلین و شناسایی باکتری‌های نوترکیب توسط غربالگری سفید- آبی در محیط IPTG-XGAL (ایالات متحده آمریکا، سیگما) انجام شد (۹). تأیید حضور ژن *dt* درون کلونی‌های سفید توسط انجام PCR با پرایمرهای M13 و سپس تعیین توالی ناحیه مذکور و همچنین مقایسه طول محصولات PCR قبل و بعد از انجام فرایند کلونینگ انجام شد (۱۰).

تعیین میزان بیان ژن *dt* در باکتری‌های نوترکیب حاصل با روش Real time PCR

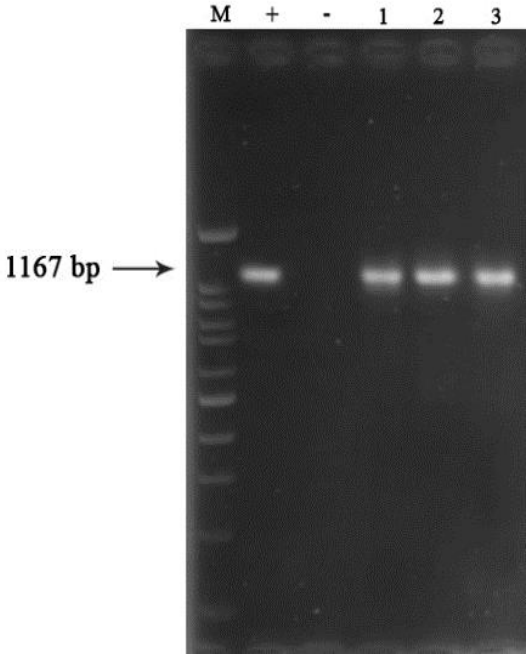
برای تأیید کارایی فرایند کلونینگ، استخراج RNA توسط میکروکیت RNeasy (خریداری شده از شرکت سیناکلون) از سوسپانسیون باکتریایی کلونی‌های سفید در فاز نمایی رشد انجام شد. سنتز CDNA با استفاده از آنزیم AMV Reverse Transcriptase (فرمنتاز، تکاپوزیست) و واکنش Real Time PCR (کوربت، آلمان) با استفاده از کیت شرکت Genet bio کره جنوبی به انجام رسید. ژن خانگی S ۱۶ به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. آنالیز میزان بیان با اندازه‌گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با کنترل منفی که باکتری *E.coli* فاقد ژن *dt* بود، انجام شد (۱۱).

رسم درخت فیلوژنی

پس از تکثیر DNA باکتری با روش PCR با ژن *16srRNA* برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. توالی‌های حاصله پس از بررسی در نرم‌افزار BioEdit (نسخه نرم افزار ۷/۰/۹/۱) توسط DNA Baser مکمل‌سازی شد. نتیجه با جدایه‌های ثبت‌شده در NCBI از طریق n Blast مقایسه و سپس در نرم‌افزار W Clustal هم‌ردیف شدند. سپس با استفاده از برنامه ۵ MEGA (تحلیل ژنتیک تکاملی مولکولی، نسخه ۵، توکیو، ژاپن) درخت‌های فیلوژنیک ترسیم شدند (۱۲).

یافته‌ها

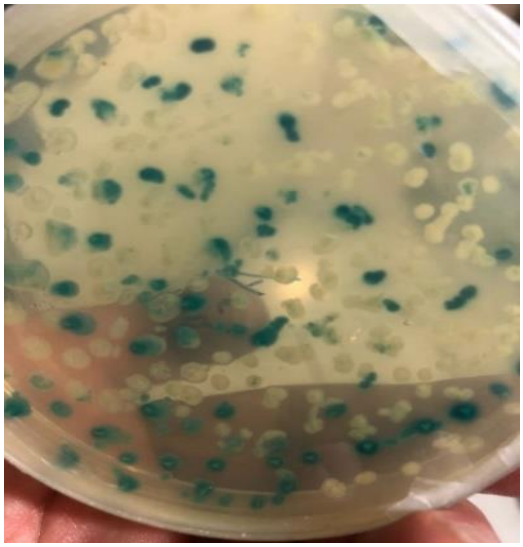
واکنش PCR برای حضور ژن *dt* (۱۱۶۷ bp) مثبت بود (شکل ۱).



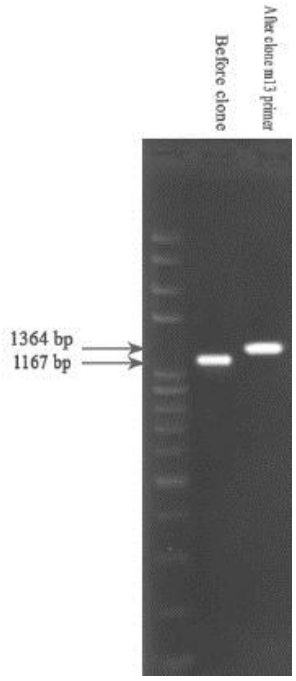
شکل ۱- نتیجه بررسی حضور ژن کپسول *dt* در کورینه باکتریوم دیفتری با آزمون PCR با استفاده از یک جفت پرایمر(۱۱۶۷ bp) ستون‌ها به ترتیب از چپ به راست: M مارکر، (+) کنترل مثبت، (-) کنترل منفی و (ردیف ۱ تا ۳) نمونه *کورینه باکتریوم دیفتری*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-09]

پس از کلون کردن سویه حامل ژن *dt* توسط کلنی سلکشن (آبی/ سفید) کلونی‌های سفید و آبی مشاهده شد(شکل ۲) که نشان‌دهنده وجود کلونی‌های نوترکیب در محیط کشت IPTG-Xgal است. تأیید نتایج کلون واکنش با پرایمر M13 با PCR نشان‌دهنده باند (۱۳۶۴ bp) بود (شکل ۳).

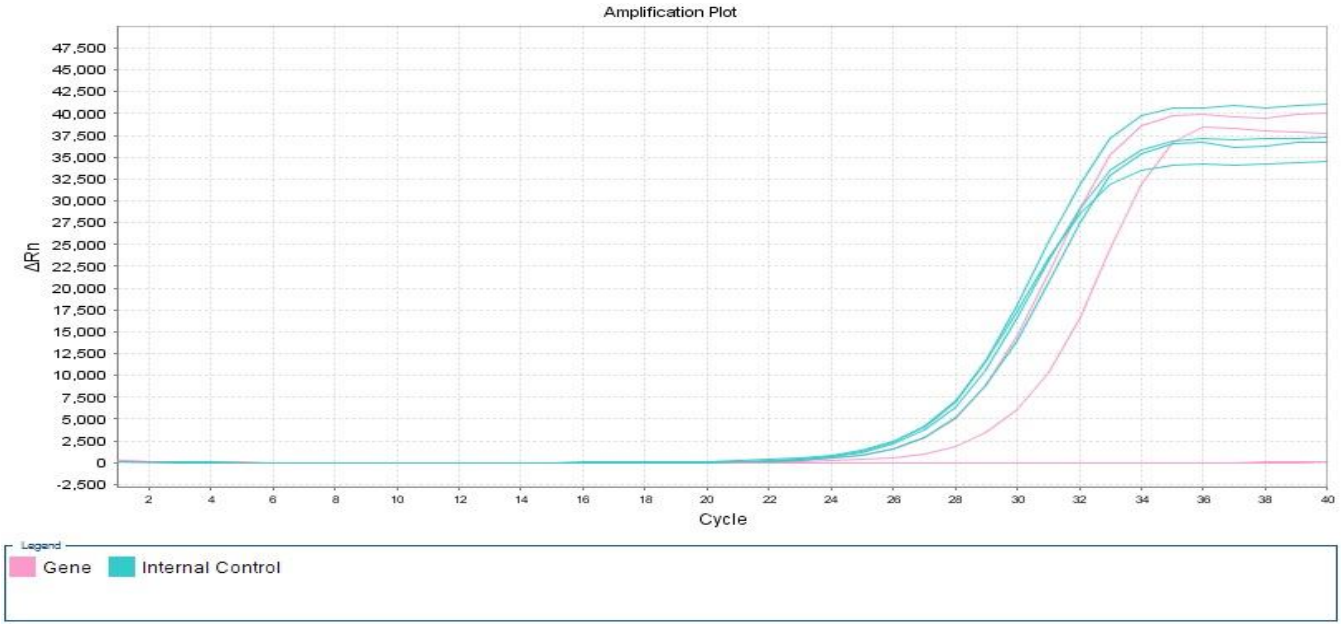


شکل ۲- کلونی های سفید و آبی حاصل از نتیجه کلون‌سازی ژن *dt*



شکل ۳- تأیید کلونینگ توسط PCR با پرایمرهای M13 بر روی کلون‌های نوترکیب و غیرنوترکیب و تأیید وجود قطعه insert درون وکتور نوترکیب (ژل آگاروز ۲ درصد).

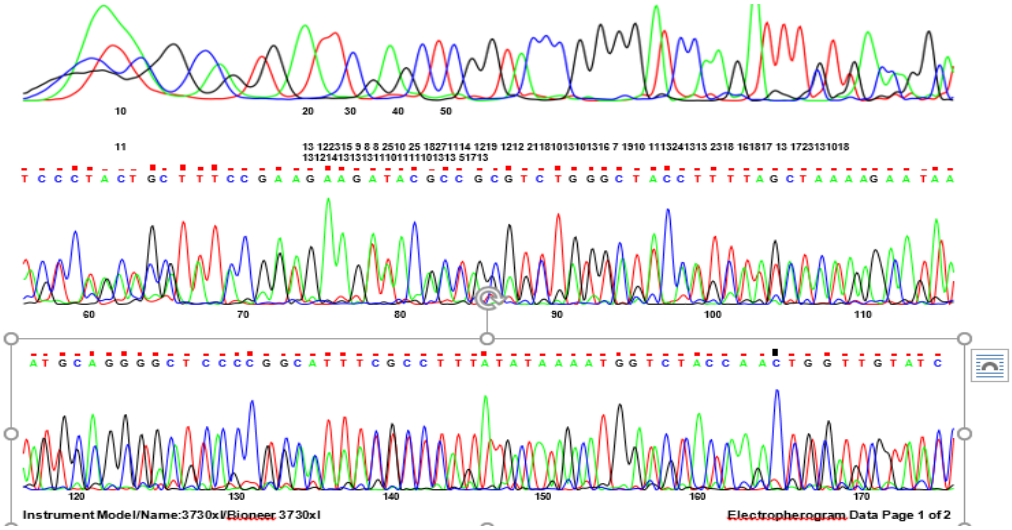
در نهایت با سکانس محصول PCR ، ورود ژن *dt* به باکتری *E.coli* XL1blue تأیید شد. همچنین نتایج Real Time PCR تأییدکننده ورود ژن *dt* در باکتری میزبان بوده است (نمودار ۱).



نمودار ۱- منحنی تکثیر ژن dt توسط Real time PCR

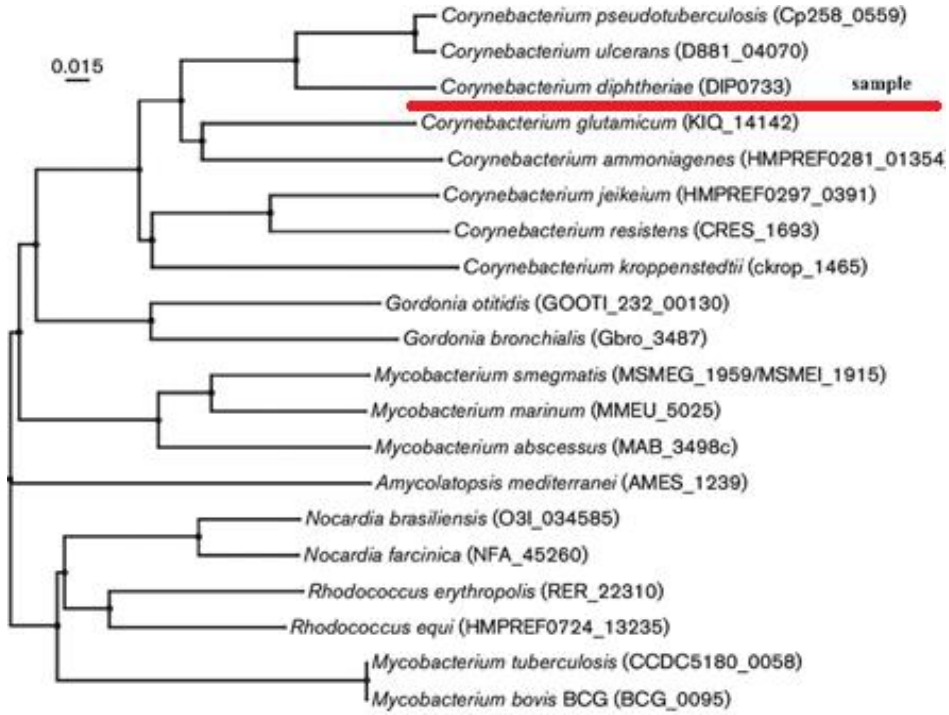
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-09]

میزان بیان ژن *dt* در دو منحنی ایجادشده توسط *E.coli* اولیه (آبی) و *E.coli* به‌کاررفته در کلونینگ ژن *dt* (صورتی)، تفاوت چشمگیری نشان می‌دهد. به طوری که در نمودار آبی هیچ بیانی از ژن *dt* قابل مشاهده نیست و در عوض در نمودارصورتی رنگ باکتری نوترکیب حاصل، میزان چشمگیری از پروتئین *dt* را تولید کرده است. نتیجه تکثیر ناحیه ژنی *16srRNA* با استفاده از تعیین توالی برای شناسایی سویه *کورینه باکتریوم* تأیید شد (شکل ۴).



شکل ۴- نتیجه DNA سکانسینگ برای ناحیه ژنی *16srRNA*

نتایج درخت فیلوژنتیکی به روش پیوند همجواری (NJ) نشان داد که گونه *کورینه باکتریوم دیفتیری* با *کورینه باکتریوم سودوتوبرکلوزیس* و *کورینه باکتریوم اولسرانس* در یک کلاد (خوشه) قرار گرفتند (شکل ۵).



شکل ۵- درخت فیلوژنی رسم شده ایزوله مطالعه حاضر بر اساس توالی ژنس *16S rRNA*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-09]

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کلونینگ ژن *dt* *کورینه باکتریوم* در سلول مستعد *E.coli XL1blue* انجام شد. در راستای مطالعه حاضر، در مطالعه Mothershed و همکاران (۲۰۰۲) در ایالات متحده آمریکا برای شناسایی زیر واحدهای *A* و *B* ژن سم *دیفتری* (*tox*)، ۲۳ سویه *کورینه باکتریوم دیفتریه* سمی، ۹ سویه غیر سمی *کورینه باکتریوم دیفتریه* و ۴۴ سویه نشان‌دهنده تنوع پاتوژن‌ها و فلور تنفسی طبیعی آزمایش قرار شدند. در نمونه‌های بررسی شده یک یا هر دو زیر واحد ژن سم در ۳۴ نمونه از ۳۶ نمونه با استفاده از روش *Real-time PCR* شناسایی و تنها ۹ نمونه با *PCR* استاندارد مثبت شدند (۲۴). Real-Time PCR یک روش جایگزین حساس‌تر و سریع‌تر نسبت به PCR معمولی برای تشخیص ژن سم در نمونه بالینی است. مطالعه مذکور به بررسی ژن سم دیفتیری در سویه‌های مختلف کورینه باکتریوم پرداخته است که تا حدودی با مطالعه حاضر همسو بود. در مطالعه اولاد در سال ۲۰۱۳ در تهران، طراحی و تهیه ژن موتانت زیرواحد کاتالیتیک دیفتریا توکسین *dtxA* و بررسی‌های بیوانفورماتیکی آن برای بررسی بیان در وکتور *pET28a* و تولید پروتئین نوترکیب حاصل از آن، به عنوان کاندیدای تهیه واکسن علیه دیفتری بررسی شد. در مطالعه وی، کلونینگ، بیان و تولید پروتئین نوترکیب حاصل به عنوان کاندیدای واکسن، با روش وسترن بلات ارزیابی شد. نتایج بیوانفورماتیکی، صحت همسان‌سازی ژن مذکور را با کمک واکنش هضم آنزیمی و الکتروفورز را تأیید کرد (۲۵). نتایج مطالعه انجام شده نشان داد که پروتئین نوترکیب حاصل می‌تواند جایگزینی مناسب به عنوان کاندیدای واکسن علیه *دیفتریاتوکسین* قرار گیرد که نیازمند مطالعه‌های بیشتر و با تحقیق ما هم‌راستا است، اما تولید واکسن نیازمند تحقیق‌های بسیار بیشتری است. محمدی و همکاران در سال ۱۳۸۹ در تهران، ژن توکسین دیفتری با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و *DNA* باکتری *کورینه باکتریوم دیفتریه*، به عنوان الگو، تکثیر و در *T* وکتور *pTZ57R* کلون و سپس در وکتور بیان *pETDuet*-۱ ساب کلون شد و با روش‌های توالی‌یابی ژن، هضم آنزیمی و واکنش PCR تأیید شد. ژن توکسین دیفتری در وکتور *pTZ57R* کلون شد (۲۶). در مطالعه حاضر ژن *dt* از طریق وکتور *ptg19* به *اشرشیا کلی* منتقل و کلون شد که با مطالعه یاد شده در یک راستا است. در مطالعه Abulmagd و همکاران (۲۰۲۲) از مصر، ژن‌های *dt* و *dtb* از سویه باکتریایی ATCC (مجموعه کشت نوع آمریکایی) شماره ۱۳۸۱۲ جدا شد. پلاسمیدهای *pET29a+dt* و *pET29a+dtb* کلون شده به *E.coli* BL21(DE3) pLysS به عنوان میزبان منتقل شدند. تولید پروتئین با عملکرد بالا و *rdtx* و *rdtb* تخلیص شده به موش‌های BALB/c تزریق و تیتر آنتی بادی ارزیابی شد. تغییرهای ژنتیکی *E.coli DH5α* و *E.coli BL21* با *pET-29a(+)* حامل ژن‌های *dt* و *dtb* توسط PCR تأیید و رشد روی محیط Luria- Bertani/ kanamycin مثبت بود (۲۷). مطالعه فوق‌الذکر با موفقیت در تهیه دو سویه اصلاح شده ژنتیکی برای تولید واکسن دیفتری و رسیدن به شرایط تولید ایده‌آل برای دستیابی به بالاترین بهره‌وری انجام شد. همچنین نتایج بررسی‌های فیلوژنتیکی انجام‌شده در مطالعه حاضر قادر است تعدادی از خویشاوندان نزدیک باکتری *کورینه باکتریوم* را به عنوان کاندیدای مطالعه‌های بعدی و نیز منبعی از ژن *dt* مورد بحث، معرفی می‌کند. با انجام مطالعه‌های بیشتر روی سایر سویه‌های تولیدکننده توکسین دیفتری و نیز به کار بردن میزبان‌های کلونینگ پرتوان‌تر، می‌توان تحقیق انجام‌شده در مطالعه حاضر را تکمیل و نقاط ضعف آن را که ممکن است در انتخاب میزبان یا سویه تولیدکننده توکسین و یا روش کلونینگ به کار رفته باشد، جبران کرد.

ازجمله محدودیت‌های این تحقیق این است که در روی یک نمونه بوده که طبعاً نمی‌تواند کافی باشد با وجود این که نمونه‌های بیشتر با خطرهایی ممکن است مواجه باشد.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-09]

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد، سویه واکسینال کورینه باکتریوم دیفتریه PW ۸ حامل ژن *dt* بود. با استفاده از کیت TA- کلونینگ ژن *dt* از طریق وکتور به سلول مستعد *E.coli XL1blue* منتقل و کلون شد. در واقع تشکیل ژن نوترکیب و کلونینگ آن به وسیله *E.coli XL1blue* با توان بالاتر و صرفه اقتصادی بیشتر و نمونه بیشتر را توصیه می‌کنیم.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه، در دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان بررسی و با کد اخلاق IR.IAU.KERMAN.REC.1401.078 ثبت شده است.

تأمین منابع

این مطالعه برگرفته از پایان‌نامه تحصیلات تکمیلی دانشجوی کارشناسی ارشد خانم سمانه صادقی می‌باشد و با هزینه شخصی ایشان تامین شده است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان انجام شد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان قدردانی و تشکر کنند.

همچنین، باتوجه به اینکه این مطالعه با هزینه شخصی سرکار خانم سمانه صادقی انجام شده است، نویسندگان از ایشان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-09]

References

1. Rosana Y, Lusiana DIG, Yasmon A. Genetic characterization of diphtheria tox B to evaluate vaccine efficacy in Indonesia. Iranian Journal of Microbiology. 2022;14(4):606-10.

2. Ghaffari K, Sarlak S, Absalan A, Afzal RR, Eghbali A, Eghbali A. Dwindled serum IgG levels of Rubella, Diphtheria toxin, Hepatitis B virus and Tetanus Toxoid after chemotherapy; a report from Iranian children with malignancy. Iranian Journal of Pediatric Hematology & Oncology. 2022.

3. Azizi MH, Bahadori M, Raees-Jalali G-A. A historical profile of diphtheria in Iran during the 19th and 20th centuries. Archives of Iranian medicine. 2012;15(3):181-186.

4. Holmes RK. Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. Journal of Infectious Diseases. 2000;181(Supplement_1):S156-S67.

5. Shafiee F, Aucoin MG, Jahanian-Najafabadi A. Targeted diphtheria toxin-based therapy: a review article. Frontiers in microbiology. 2019;10:2340.

6. Pembroke B, Will RC, Madhav A, Shetty V, Mutreja A. Diphtheria and the AB Toxin Group. 2023.

7. Goodall EC, Azevedo Antunes C, Möller J, Sangal V, Torres VVL, Gray J, et al. A multiomic approach to defining the essential genome of the globally important pathogen Corynebacterium diphtheriae. PLoS Genetics. 2023;19(4):e1010737.

8. Donyapoor F ,Zeinoddini M, Saeedinia AR. Cloning and expression of recombinant immunotoxin using diphtheria toxin and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). J Arak Un Med Sci. 2016;19(5):42-50.

9. Bai JN, Zhang Y, Zhao BH. Cloning of alpha-beta fusion gene from Clostridium perfringens and its expression. World journal of gastroenterology. 2006;12(8):1229-34.

10. Seyed Sayyah P, Golestani Eimani B, Pilehchian Langroudi R. Cloning of Clostridium perfringens Iota toxin gene in Escherichia coli. Archives of Razi Institute. 2018;73(2):107-11.

11. Osman GH, Soltane R, Saleh I, Abulreesh HH, Gazi KS, Arif IA, et al. Isolation, characterization, cloning and bioinformatics analysis of a novel receptor from black cut worm (Agrotis ipsilon) of Bacillus thuringiensis vip 3Aa toxins. Saudi Journal of Biological Sciences. 2019;26(5):1078-83.

12. Shirazi G, Doosti A. Cloning and sequencing 5'and 3'SipA gene of Salmonella enteritidis in E. coli. Journal of Food Microbiology. 2016;2(4):29-37.

13. Guglielmini J, Hennart M, Badell E, Toubiana J, Criscuolo A, Brisse S. Genomic epidemiology and strain taxonomy of Corynebacterium diphtheriae. Journal of Clinical Microbiology. 2021;59(12):10-128.

14. Bigio M, Rossi R, Nucci D, Antoni G, Rappuoli R, Ratti G. Conformational changes in diphtheria toxoids: analysis with monoclonal antibodies. FEBS letters. 1987;218(2):271-6.

15. Smith T. Active immunity produced by so called balanced or neutral mixtures of diphtheria toxin and antitoxin. The Journal of Experimental Medicine. 1909;11(2):241-56.

16. Ramon G. Sur la toxine et sur l'anatoxine diphtheriques. Ann. Inst. Pasteur. 1924;38(1).

17. Vashishtha VM, Upadhyay UA. Diphtheria, Tetanus and Pertussis Vaccines. FAQ on Vaccines and Immunization Practices. 2020; 224.

18.. Viana MV, Profeta R, Cerqueira JC, Wattam AR, Barh D, Silva A, Azevedo V. Evidence of episodic positive selection in Corynebacterium diphtheriae complex of species and its implementations in identification of drug and vaccine targets. PeerJ. 2022;10:e12662.

19. Khoshakhlagh AH, Mohammadzadeh M, Manafi SS, Yousefian F, Gruszecka-Kosowska A. Inhalational exposure to formaldehyde, carcinogenic, and non-carcinogenic risk assessment: A systematic review. Environmental Pollution. 2023;121854.

20. Oldrini D, Di Benedetto R, Carducci M, De Simone D, Massai L, Alfini R, Galli B, Brunelli B, Przedpelski A, Barbieri JT, Rossi O. Testing a Recombinant Form of Tetanus Toxoid as a Carrier Protein for Glycoconjugate Vaccines. Vaccines. 2023;11(12):1770.

21. Nascimento IP, Leite L. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. Brazilian journal of medical and biological research. 2012;45:1102-11.

22. Kolybo DV, Labyntsev AA, Korotkevich NV, Komisarenko SV, Romaniuk SI, Oliinyk OM. Immunobiology of diphtheria. Recent approaches for the prevention, diagnosis, and treatment of disease. Biotechnologia acta. 2013;6(4):043-62.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-09]

23. Lobeck K, Drevet P, Léonetti M, Fromen-Romano C, Ducancel F, Lajeunesse E, Lemaire C, Ménez A. Towards a recombinant vaccine against diphtheria toxin. Infection and immunity. 1998;66(2):418-23.

24.Mothershed EA, Cassiday PK, Pierson K, Mayer LW, Popovic T. Development of a real-time fluorescence PCR assay for rapid detection of the diphtheria toxin gene. Journal of clinical microbiology. 2002;40(12):4713-9.

25. Olad GR. Designing and bioinformatics study of synthetic mutated Diphtheria toxin (dtxA) catalytic domain gene and survey of its recombinant protein exprassion as vaccine candidate. Journal title. 2013;21(5):160-71.

26. Mohammadi N, Pakzad P, Bandapour M, Yarian F, Yazdanfar M and Kazemi B. Cloning of the toxin gene Corynebacterium diphtheria. Microbial knowledge science, 2019, 6: 37-42.

27. Abulmagd S, Khattab AEA, Zedan H. Expression of full and fragment-B of diphtheria toxin genes in Escherichia coli for generating of recombinant diphtheria vaccines. Clinical and experimental vaccine research. 2022;11(1):12-29.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2025-08-09]