

کلونینگ و شناسایی ژن GRA4 توکسوپلازما گوندهای سویه RH در پلاسمید یوکاریوت بیانی pcDNA3

ناهید ماسبی^۱، دکتر فاطمه غفاری فر^{۲*}، دکتر زهره شریفی^۳، دکتر عبدالحسین
دلیمی اصل^۴ و حسین وزینی قیصر^۵

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲. دانشیار گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. استادیار گروه ویروس شناسی سازمان انتقال خون
۴. استاد گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۵. دانشجوی دکترا گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

Email: ghafarif@modares.ac.ir

نویسنده مسئول: دکتر فاطمه غفاری فر

چکیده

مقدمه و هدف: توکسوپلازموزیس به وسیله یک انگل تک یاخته داخل سلولی (توکسوپلازما گوندهای) ایجاد می شود و در سراسر جهان گسترش دارد. این بیماری دارای اهمیت عمده پزشکی و دامپزشکی است و عامل بیماری مادرزادی در انسان و حیوانات اهلی است. علاوه بر این، به تازگی به دلیل آنسفالیت در افراد ایدزی به اهمیت آن افزوده شده است. به همین دلیل تهیه یک واکسن مؤثر علیه توکسوپلازما یک هدف مهم در جهان است. آنتی ژن گرانولی 4 (GRA4) به عنوان یک آنتی ژن عمده توکسوپلازما گوندهای شناخته شده است. از این رو، به عنوان یک کاندیدا برای تهیه واکسن ملاحظه شده است. آنتی ژن گرانولی 4 از برادی زوئیت ها و تاکی زوئیت ها ترشح می شود. این ژن به صورت کپی تک و فاقد اینترون است. هدف از این تحقیق، تهیه پلاسمید نو ترکیب حاوی ژن GRA4 است که بتوان از آن به عنوان DNA واکسن استفاده کرد.

مواد و روش کار: در این تحقیق ژن GRA4 پس از تکثیر به روش PCR در پلاسمید pTZ57R کلون شد. سپس در باکتری اشرشیاکلی سوش TGI ترانسفورم شد. پلاسمید نو ترکیب پس از تکثیر از باکتری میزبان استخراج و ژن هدف با استفاده از برش آنزیمی، با آنزیم های KpnI و EcoRI از پلاسمید pTZ57R جدا شد. از طرف دیگر پلاسمید pcDNA3 برای پذیرش قطعه GRA4 و انجام کلونینگ نیز با آنزیم های KpnI و EcoRI برش داده شد. GRA4 درون پلاسمید pcDNA3 ساب کلون شد و این محصول واکنش اتصال در باکتری های فوق ترانسفورم شده و در محیط LB حاوی آمپی سیلین کشت داده شدند؛ پلاسمیدهای نو ترکیب pcGRA4 به وسیله کیت استخراج پلاسمید، از اشرشیاکلی تخلیص شدند.

نتایج: صحت کار با روش های PCR و برش آنزیمی به کمک آنزیم های اختصاصی فوق با استفاده از الکتروفورز تأیید شده و نتایج نشان داد، قطعه GRA4 در پلاسمید pcDNA3 کلون شده است و باند حدود ۱۰۵۸ جفت بازروی ژل آگاروز ایجاد شده بود که هم اندازه ژن GRA4 توکسوپلازما گوندهای است و تأیید نهایی با استفاده از توالی یابی انجام شد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل نشان داد، کلونینگ و ترانسفورم قطعه GRA4 در پلاسمید pcDNA3 با موفقیت انجام شده است.

واژگان کلیدی: توکسوپلازما گوندهای، کلونینگ، GRA4، pcDNA3

دوماهنامه علمی - پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هفدهم - شماره ۸۵
اسفند ۱۳۸۸

وصول: ۸۸/۶/۲

آخرین اصلاحات: ۸۸/۱۱/۲۸

پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۷

مقدمه

توکسوپلازموزیس یکی از معمول‌ترین بیماری‌های انگلی با گسترش جهانی است. عامل آن، توکسوپلازما گونده‌ای، یک تک‌یاخته چندمیزبانه اختیاری است [۱]. این تک‌یاخته قادر است تمام پستانداران از جمله انسان را آلوده کرده و باعث توکسوپلازموزیس شود و این طیف وسیع میزبانی آن را به یکی از موفق‌ترین انگل‌های تک‌یاخته‌ای تبدیل کرده است. به دلیل اهمیت برای سلامت عموم و شرایط اقتصادی تهیه یک واکسن مؤثر علیه توکسوپلازما یک هدف مهم در جهان است. تنها واکسن موجود تاکنون، واکسن زنده تهیه‌شده از تاک‌ی‌زوئیت‌های S48 است [۲]. واکسن‌های زنده خطر عفونت تصادفی و موتانت‌های معکوس مضر غیرقابل پیش‌بینی برای انسان دارند. برای غلبه بر این مشکلات، تحقیقات اخیر برای واکسن‌های ساب‌یونیت، نوترکیب و واکسن‌های DNA انجام می‌شود، اما آن‌ها محافظت کامل علیه توکسوپلازما گونده‌ای ایجاد نمی‌کنند [۳]. از جمله کاندیداهای واکسن، آنتی‌ژن‌های گرانولی (GRAs) (Granular Antigens) هستند. *GRA4* به‌عنوان یک آنتی‌ژن عمده توکسوپلازما گونده‌ای شناخته شده و از این‌رو، به‌عنوان یک کاندیدا برای تهیه واکسن ملاحظه شده است [۴]. هدف از این مطالعه، کلون کردن قطعه *GRA4* در پلاسمید یوکاریوت بیانی pcDNA3 و ترانسفورم این پلاسمید نوترکیب، در باکتری *E. coli* سوش TG1 است. *GRA4* از برادی‌زوئیت‌ها و تاک‌ی‌زوئیت‌ها ترشح می‌شوند. ژن کدکننده *GRA4* به‌صورت تک‌نسخه و فاقد اینترون و تولیدکننده یک mRNA است [۵]. به‌منظور این‌که ژن *GRA4* در سلول یوکاریوت مانند عضلات موش قابلیت بیان پیدا کند و در آینده بتوان از آن برای بررسی ایمنی‌زایی استفاده کرد، کلون کردن ژن *GRA4* در یک پلاسمید یوکاریوت اهمیت دارد. به‌این دلیل، در این مطالعه از پلاسمید pcDNA3 استفاده شد.

مواد و روش کار

تکثیر انگل توکسوپلازما

برای این مطالعه ابتدا مایع صفاقی حاوی ۳۰-۲۰ تاک‌ی‌زوئیت زنده توکسوپلازما گونده‌ای به‌طور داخل صفاقی به موش BALB/c ماده تلقیح و پس از گذشت ۳

روز، مایع صفاقی موش‌های آلوده به‌وسیله سرنگ‌ها جمع‌آوری شد [۶].

استخراج DNA (DNA Extraction)

استخراج DNA به روش فنل و کلروفورم انجام شد. به‌این ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر (حدود $10^7 \times 5$) از تاک‌ی‌زوئیت‌های تغلیظ‌شده و شست‌وشو شده با بافر PBS درون یک ویال ۱/۵ سی‌سی ریخته و با ۹۰۰ میکرولیتر بافر لیز مخلوط شد. به منظور لیز شدن تاک‌ی‌زوئیت‌ها، ۱۰ میکرولیتر پروتیناز K به ویال اضافه و به مدت دو ساعت در بن‌ماری 55°C قرار داده شد [۷].

طراحی پرایمرها

به‌منظور طراحی پرایمرهای Forward (رفت) و Reverse (برگشت)، ابتدا توالی DNA ژن کدکننده آنتی‌ژن گرانولی ۴ (*GRA4*) از اطلاعات بانک ژنی از سایت اینترنتی <http://www.ncbi.com> با شماره EU660037 به‌دست آمد.

```
acgaattctcaaatgcagggcacttggtttctttattgtcgtcgtcatggtgcat
cttgctgtggaggtagtgagcttggctctcacctcgcagatagcgggacct
ctcggggcgcatgacaagaagccatcagggcgaagaaagagatactaccact
cgatgtacggaaccaactccgtatccctacgcaaatggacagcaggcctctcca
ctctctcagggacagctactattatccaaacctgatggatcttcatgatcgtag
accaacaaggcgtcccaggtgccccagggcggggaggccccgggtctcc
catgaatggcgttactacatgctacaggtgtctactgcacaaagtcgttccag
gaacacctgtgacccccgtacagcggattccgcagcagcctcttcgcacacaag
caacggccacctattatccccggcagcagctcctcctcccgtctcagttttgt
cttcaccccatctctgttcaaccgggtgagggtgactcccggttattctgtct
cgatgtgagacaacagctctcaatcaggttacgctatccaggtactactctactc
cagcctccaccaccagcgtgctacggctaccaggtttccggcatttccacgg
ctgccccggtttctgactcagtttctcaactgaagatagtgggcttacaggc
gtcaaaagactgtcctctgaatccacggctcagccggcagacgaagctgctt
cggagtcggaagaggagacaagaacagcaggaaatctaaggtcaagaagg
aatcctgacggggttagggtagcagcaacgctggcagcagcagcggccgccc
gcaaaggctgtcaaggatgttggtgaccgccgcttccacggcgcctgctgag
gctggaaaaacggagttggacgacgatatgcccgccccattcaaccggc
accctcacctcagccgagttattgaaggattggaagaatgcgcaaaagagaaatt
cgt
```

سپس با استفاده از این اطلاعات و به کمک نرم‌افزار GenRuner، جفت پرایمرها به صورت زیر طراحی شدند:

(*Gra4-F*, 5'-CGCGGGTACCATGCAGGGCACTTGGTTTTC-3')



۳۰ جفت باز محل اثر آنزیم KpnI

(*Gra4-R*, 5'-CGCGGAATTCCTCACTCTTTCGCGCATTCTTT-3')



۳۰ جفت باز محل اثر آنزیم EcoRI

تکثیر ژن *GRA4* با کمک تکنیک PCR

برای انجام PCR واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر براساس دستورالعمل شرکت سیناژن شامل مواد زیر تهیه شد:

۱۰ × PCR buffer	۲/۵ μl
۵۰ mM MgCl ₂	۰/۷۵ μl
۱۰ mM dNTP	۰/۵ μl
۱۰ Pomol/μl primer forward	۱ μl
۱۰ Pomol/μl primer Reverse	۱ μl
(5u/μl) Taq DNA Polymerase	۰/۵ μl
Extracted DNA	۳ μl
ddH ₂ O	۱۵/۷۵ μl

مواد فوق درون ویال ۰/۵ سی سی ریخته و پس از ورتکس و spin داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد و براساس برنامه زیر PCR انجام گرفت:

مرحله دناتوریشن شدن ۱ دقیقه در ۹۴ درجه، مرحله اتصال پرایمرها ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه، مرحله سنتز DNA ۱ دقیقه در ۷۲ درجه و تعداد ۳۰ سیکل

کلونینگ ژن *GRA4* در پلاسمید *pTZ57R*

در این تحقیق کلونینگ ژن *GRA4* به کمک کیت کلونینگ T/A (Cloning Kit) شرکت Fermentas و به روش ذیل انجام گرفت:

10X ligation buffer	۳ μl
T ₄ DNA ligase	۱ – ۵ unit
pTZ57R/T	۳ μl
PCR product	۱۵ μl
PEG	۳ μl
ddH ₂ O up to	۳۰ μl

مواد فوق در یک لوله میکروپیوژ ۰/۵ میکرولیتری ریخته و به طور شبانه در دمای ۲۲°C انکوبه شد و محصول واکنش اتصال تا مرحله بعد در ۲۰°C نگهداری شد.

انتقال پلاسمید کلون شده به باکتری مستعد *TG1*

ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی انجام شد که به طور خلاصه به ترتیب است:

۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد از فریز ۷۰°C در آورده و به مدت نیم ساعت درون ظرف یخ گذاشته شد. سپس ۵-۱۰ میکرولیتر محصول واکنش اتصال به آن اضافه شد و

به آرامی با هم مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ قرار گرفت؛ مخلوط فوق در دمای ۴۲°C به مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلافاصله روی یخ قرار گرفت. ۵۰۰ میکرولیتر محیط L.B مایع بدون آنتی بیوتیک به مخلوط فوق اضافه و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در ۳۷°C قرار داده شد. پس از دریافت DNA خارجی توسط سلول‌ها می‌توان آن‌ها را به طور مستقیم کشت داد.

غربال کردن کلونی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب

برای بررسی وجود یا عدم وجود قطعه مورد نظر، این باکتری‌ها در محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین، سوبسترای X-gal (۵-برمو-۴-کلرو-۳-این‌دولیل β-D گالاکتوپیرانوزید) و IPTG به روش زیر کشت داده شدند: مقدار ۱۰۰-۲۰۰ میکرولیتر سلول‌های ترانسفورم شده به یک پلیت حاوی X-gal و IPTG، اضافه و به کمک میله شیشه‌ای در تمام نقاط پلیت پخش شد. پلیت‌ها به صورت وارونه و شبانه (۱۶-۱۸h) در ۳۷°C انکوبه شد. سپس به مدت چندین ساعت در دمای ۴°C قرار داده شد تا کلنی‌های آبی یا سفید ظاهر شود. در این محیط کشت کلنی‌های فاقد پلاسمید نوترکیب به رنگ آبی و کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب به رنگ سفید خواهند بود [۷].

روش‌های تأیید کلونینگ

مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های آبی و سفید پلاسمیدها براساس دستورالعمل شرکت سازنده (Fermentas) از کلنی‌های سفید و آبی استخراج شد. سپس روی ژل آگاروز مقایسه شدند. پلاسمیدهای موجود در کلنی‌های سفید (به دلیل وجود قطعه کلون شده در آن) سنگین‌تر از پلاسمیدهای موجود در کلنی‌های آبی هستند [۷].

تکنیک PCR برای تأیید کلونینگ

پلاسمیدهای نوترکیب مورد نظر از سایر پلاسمیدها جدا شد. واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با شرایط مذکور در بالا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و ۳

میکرولیتر پلاسمید استخراج شده از کلنی‌های سفید، به‌عنوان الگو انجام شد.

تعیین توالی مولکولی DNA

تعیین توالی قطعه کلون شده در پلاسمید pTZ57R به‌وسیله شرکت ژن فناوری‌انجام و به کمک سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast از نظر تشابهات و اختلافات با سویه RH استاندارد توکسوپلازما گونده‌ای در بانک ژنی مقایسه شد.

ساب کلون ژن *GRA4* در پلاسمید بیانی *pcDNA3*

برای ساب کلونینگ *GRA4* در پلاسمید یوکاریوت بیانی *pcDNA3* مراحل ذیل انجام شد:

برش آنزیمی پلاسمید *pTGRA4* و جدا کردن قطعه *GRA4*

براساس دستورالعمل کیت شرکت Fermentas واکنش آنزیمی به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب *pTGRA4*، ۱ میکرولیتر آنزیم *EcoRI*، ۱ میکرولیتر آنزیم *KpnI*، ۲ میکرولیتر بافر تانگو و ۱۱ میکرولیتر آب مقطر تهیه و پس از ورتکس و *spin* مخلوط فوق به‌طور شبانه در بن‌ماری 37°C قرار داده شد. همچنین پلاسمید *pcDNA3* برای پذیرش قطعه *GRA4* و انجام کلونینگ تحت آنزیم‌های فوق برش داده شد و نتایج برش آنزیمی هر کدام روی ژل آگاروز مشاهده شد.

کلونینگ ژن *GRA4* در پلاسمید *pcDNA3*

برای این منظور، واکنش اتصال براساس دستور سازنده کیت (Fermentas) به حجم ۳۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر پلاسمید *pcDNA3* آنزیم خورده، ۱۵ میکرولیتر ژن *GRA4*، ۲ میکرولیتر آنزیم *T4DNA ligase*، ۳ میکرولیتر بافر و ۵ میکرولیتر آب مقطر تهیه و به‌طور شبانه در بن‌ماری 16°C - 14°C انجام شد.

انتقال پلاسمیدهای کلون شده داخل ناقل *TG1*

انتقال پلاسمیدهای کلون شده *pcGRA4* داخل ناقل *TG1* براساس دستورالعمل گفته شده در قسمت بالا انجام شد.

غریب کردن کلونی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب *pcGRA4* مقدار ۲۵۰-۲۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های ترانسفورم شده را روی پلیت LB حاوی آنتی‌بیوتیک (آمپی‌سیلین) ریخته و با میله شیشه‌ای روی محیط جامد پخش و به‌طور شبانه در 37°C انکوبه شد. تنها باکتری‌هایی که پلاسمید را دریافت کرده بودند قادر بودند روی محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین رشد کنند [۷].

روش‌های تأییدکننده کلون شدن قطعه *GRA4* در

پلاسمید بیانی *pcDNA3*

مقایسه باند پلاسمیدهای *pcDNA3* و *pcGRA4* محصول استخراج پلاسمیدهای *pcDNA3* و *pcGRA4* روی ژل آگاروز ۱ درصد لود و الکتروفورز شد.

PCR ژن *GRA4* با استفاده از پلاسمید نوترکیب

pcGRA4 به‌عنوان الگو

واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با شرایط مذکور در قسمت بالا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و ۳ میکرولیتر پلاسمید *pcGRA4* به‌عنوان الگو انجام شد.

برش پلاسمید نوترکیب *pcGRA4* با آنزیم‌های *EcoRI* و *KpnI*

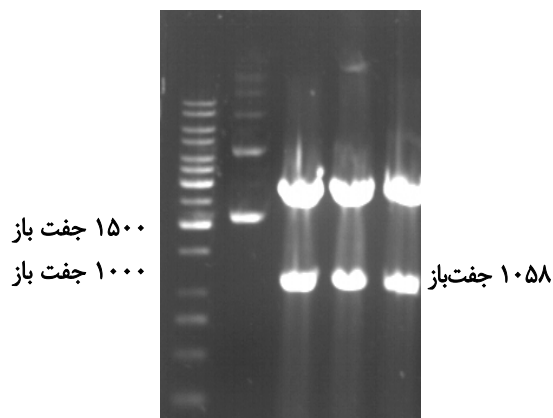
برش آنزیمی به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب *pcGRA4*، ۱ میکرولیتر آنزیم *EcoRI*، ۱ میکرولیتر آنزیم *KpnI*، ۲ میکرولیتر بافر تانگو و ۱۱ میکرولیتر آب مقطر مطابق با شرایط مذکور در قسمت بالا انجام شد.

نتایج

نتایج PCR به کمک DNA ژنومی

نتایج حاصل از واکنش PCR با DNA ژنومی نشان داد، فقط یک باند حدود ۱۰۵۸ جفت باز روی ژل آگاروز ایجاد شده بود که هم‌اندازه ژن *GRA4* توکسوپلازما گونده‌ای است و هیچ ژن دیگری غیر از آن تکثیر نشده بود؛ بنابراین پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن *GRA4* اختصاصی بودند (شکل ۱).

پTZ57R بود. بنابراین نتایج برش آنزیمی روی ژل آگاروز، کلون ژن *GRA4* درون پلاسمید pTZ57R را نشان داد (شکل ۳).



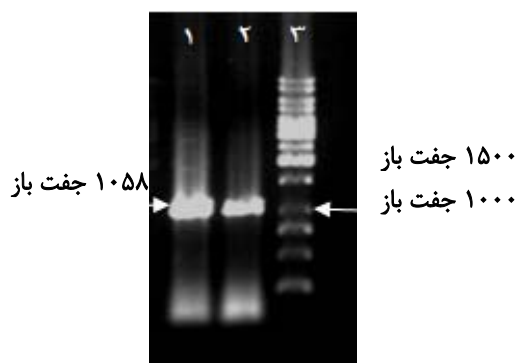
شکل ۳. نتایج برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pTGRA4 روی ژل آگاروز ۱ درصد، ستون ۱ مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، ستون ۲ پلاسمید pTGRA4 آنزیم نخورده، ستون‌های ۳-۵ پلاسمید pTGRA4 آنزیم خورده و قطعه ۱۰۵۸ جفت بازی از آن جدا شده است.

نتایج تعیین توالی

نتایج حاصل از تعیین توالی ژن *GRA4* در پلاسمید pTZ57R نشان داد که این ژن با ژن *GRA4* توکسوپلازما گونه‌ای دارای شماره EU660037 در بانک ژنی حدود ۹۸ درصد تشابه داشت.

نتایج ترانسفورماسیون باکتری‌ها با محصول واکنش اتصال مرحله

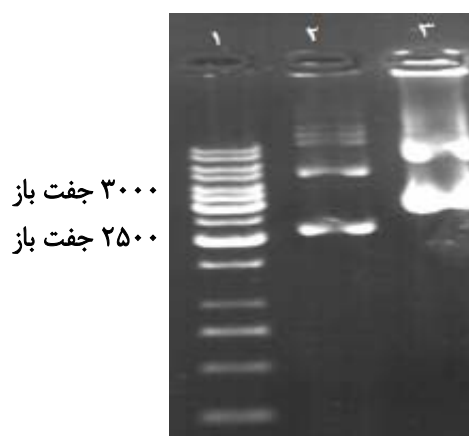
ظهور کلنی باکتری‌ها روی محیط LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، نشان‌دهنده ترانسفورماسیون موفق پلاسمید در باکتری‌ها بود. هر دو پلاسمید pcDNA3 و pcGRA4 استخراج شده از باکتری‌های ترانسفورم شده روی ژل آگاروز سه باند نشان دادند و pcGRA4 در مقایسه با pcDNA3 مقداری بالاتر بود که تأییدکننده کلون قطعه *GRA4* در پلاسمید pcDNA3 بود (شکل ۴).



شکل ۱. الکتروفورز محصول استخراج DNA ژنومی روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد، ستون شماره ۱ و ۲ قطعه *GRA4* اندازه ۱۰۵۸ جفت باز، ستون ۳ مارکر ۱۰۰۰ جفت باز

مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های سفید و آبی

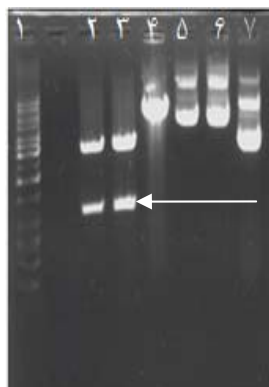
ظهور کلونی‌های سفید و آبی روی محیط LB حاوی آمپی‌سیلین و آغشته به X-gal و IPTG نشان‌دهنده ترانسفورماسیون موفق بود. پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی‌های سفید به دلیل سنگینی در ژل آگاروز مقداری بالاتر از کلونی‌های آبی قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲. نتایج الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های آبی و سفید روی ژل آگاروز ۱ درصد، ستون ۱ مارکر دارای ۱۰۰۰ جفت باز، ستون ۲ پلاسمید pTZ57R ستون ۳ پلاسمید نو ترکیب pTGRA4

برش آنزیمی پلاسمیدهای pTGRA4 دو باند نشان داد؛ یک باند ۱۰۵۸ جفت باز که هم‌اندازه ژن *GRA4* توکسوپلازما گونه‌ای و باند دیگر تقریباً هم‌اندازه

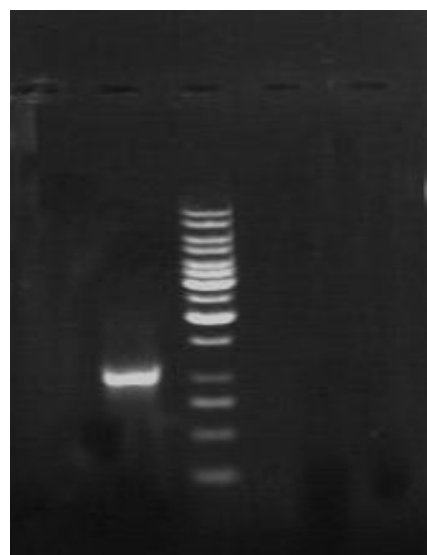
از جمله کاندیداهای واکسن، آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی هستند. *GRA4* به‌عنوان یک آنتی‌ژن عمده توکسوپلازما گونده‌ای شناخته شده و از این‌رو، به‌عنوان یک کاندیدا برای تهیه واکسن ملاحظه شده است [۴].



شکل ۴. نتایج الکتروفورز مقایسه باند pcDNA3 و *pcGRA4* روی ژل آگاروز ۱ درصد، ستون ۱ و ۲ پلاسمید *pcGRA4* ستون ۳ پلاسمید pcDNA3

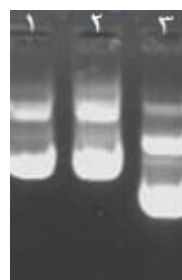
۱۰۵۸ جفت باز
۱۵۰۰ جفت باز
۱۰۰۰ جفت باز
۷۵۰ جفت باز

شکل ۵. نتایج برش آنزیمی پلاسمید *pcGRA4* و pcDNA3 روی ژل آگاروز ۱ درصد، ستون ۱ مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، ستون ۲ و ۳ پلاسمید *pcGRA4* برش خورده، ستون ۴ پلاسمید pcDNA3 برش خورده، ستون ۵ و ۶ *pcGRA4* برش نخورده، ستون ۷ پلاسمید pcDNA3 برش نخورده



شکل ۶. الکتروفورز محصول PCR به کمک پلاسمید *pcGRA4* به‌عنوان الگو روی ژل آگاروز ۱ درصد، ستون ۱ پلاسمید *pcDNA3* ستون ۲ محصول PCR (۱۰۵۸ جفت باز)، ستون ۳ مارکر ۱۰۰۰ جفت باز

۱۰۰۰ جفت باز
۷۵۰ جفت باز
۵۰۰ جفت باز
۲۵۰ جفت باز



شکل ۴. نتایج الکتروفورز مقایسه باند *pcGRA4* و pcDNA3 روی ژل آگاروز ۱ درصد، ستون ۱ و ۲ پلاسمید *pcGRA4* ستون ۳ پلاسمید pcDNA3

نتایج برش آنزیمی پلاسمید نو ترکیب *pcGRA4*

نتایج برش آنزیمی *pcGRA4* با آنزیم‌های *EcoRI* و *KpnI* دو باند نشان داد که یکی حدود ۵۴۰۰ جفت باز بود و باند دیگر حدود ۱۰۵۸ جفت باز که برابر با قطعه *GRA4* است و ساب‌کلون قطعه *GRA4* درون pcDNA3 تأیید شد (شکل ۵).

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR پلاسمید *pcGRA4* با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده تنها یک باند را نشان داد که هم‌اندازه قطعه *GRA4* بود، بنابراین ژن *GRA4* از پلاسمید *pcGRA4* به‌عنوان الگو استفاده کرده و تکثیر شده بود، اما در نتایج حاصل از PCR پلاسمید pcDNA3 هیچ بانندی نشان داده نشد (شکل ۶).

بحث

توکسوپلازما گونده‌ای یک انگل تک‌یاخته‌ای داخل سلولی است که باعث مرگ و میر و ناخوشی در افراد دارای نقص ایمنی و عفونت‌های مادرزادی می‌شود [۸].

واکسیناسیون DNA روش قدرتمندی برای القای پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال است که با تزریق پلاسمید DNA برهنه به داخل میزبان، سلول‌های میزبان پروتئین کدشده را بیان می‌کنند [۹].

واکسن‌هایی که به‌طور تجاری در دسترس هستند، به‌طور عمده واکسن‌های زنده ضعیف‌شده یا واکسن‌های نو ترکیب یافته هستند [۶]. در سال‌های اخیر، فناوری پیشرفته واکسیناسیون DNA آینده خویی را برای توسعه و ایجاد واکسن‌های چندظرفیتی ارائه کرده است [۶].

مختلف توکسوپلازما گونه‌ای است. در روش برش آنزیمی قطعه ۱۰۵۸ جفت بازی جدا شد که هم‌اندازه ژن *GRA4* توکسوپلازماگونه‌ای بوده و در حقیقت ساب‌کلون این ژن را در پلاسمید pcDNA3 تأیید می‌کرد. نتایج حاصل از PCR پلاسمید *pTGRA4* و *pcGRA4* نشان داد، تنها ژن *GRA4* تکثیر شده و هیچ ژن دیگری تکثیر نشده است. پس این نتایج تأیید می‌کرد آغازگرهای طراحی شده اختصاصی عمل کرده‌اند. تمام نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، بیانگر این است که کلون این ژن در این پلاسمیدها با موفقیت انجام شده است.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد، می‌توان با استفاده از پلاسمیدهای نو ترکیب برای تهیه واکسن علیه بیماری‌های انگلی در آینده امیدوار بود.

تشکر و قدردانی

مطالب این مقاله مربوط به بخشی از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس است و تمامی اعتبارات آن را دانشگاه مذکور تأمین کرده است. بنابراین از تمامی اعضای محترم گروه انگل‌شناسی پزشکی، معاونت محترم پژوهشی دانشکده پزشکی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر و قدردانی را دارد.

ژانگ و همکاران در سال ۲۰۰۷ و برای ارزیابی ایمنی‌زایی علیه توکسوپلازما، پلاسمید نو ترکیب بیانی و ویروس واکسینا را که هر دو حاوی این ژن بودند، با هم ترکیب و به موش تزریق کردند. در موش‌های ایمن‌شده با این واکسن، آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن گرانولی ۴ و به مقدار بسیار بالایی ایتترفرون گاما تولید شد و موش‌هایی که با دوز کشنده توکسوپلازما گونه‌ای چالش شدند، به‌طور کامل زنده ماندند. علاوه بر این، تشکیل کیست در موش‌های ایمن‌شده با رژیم اولیه و تقویت‌کننده هتولوگ مهار شد [۴].

دسولم و همکاران در سال ۲۰۰۰ ژن *GRA4* را در پلاسمید وکتور بیانی یوکاریوت کلون کردند و اثر ایمونیزاسیون DNA را در موش‌های حساس C57BL/6 با واکسیناسیون آن‌ها مشاهده کردند که ایمونیزاسیون با *PGRA4* باعث می‌شود ۶۲ درصد از موش‌های آلوده C57BL/6 زنده بمانند [۱۰].

در این تحقیق، آنالیز تعیین توالی ژن *GRA4* توکسوپلازما گونه‌ای در پلاسمید pTZ57 با استفاده از سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast نشان داد، قطعه ۱۰۵۸ جفت بازی در این پلاسمید کلون شده است و هیچ ایترونی در ژن موردنظر وجود ندارد. همچنین این ژن با سویه RH توکسوپلازماگونه‌ای دارای شماره EU660037 در بانک ژنی دارای ۹۸ درصد تشابه است و این شباهت نشان‌دهنده حفظ توالی ژن در سویه‌های

منابع

1. Walter F, Isabelle V, Babill S-P, Anne D, Maija L, Jean-Michel P, Pal AJ, Klaus H, Anne N. Treatment of toxoplasmosis during pregnancy: A multicenter study of impact on fetal transmission and children's sequelae at age 1 year. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180(2): 410-415.
2. Buxton D, Thomson K, Maley S, Wright S, Bos HJ. Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. *Vet Rec* 1991; 129: 89-93
3. Bout DT, Mevelec M-N, Velge-Roussel F, Dimier-Poisson I, Lebrun M. Prospects for a human *Toxoplasma* vaccine. *Curr Drug Targets - Immune Endocr Metab Dis* 2002; 2: 227-234.
4. Zahnag G, Huong VTT, Battur B, Zhou J, Zhang H, Liao M, Kawase O, Lee EG, Dautu G, Igarashi M, Nishikawa Y, Xuan X. A heterologous prime-boost vaccination regime using DNA and a vaccinia virus, both expressing *GRA4*, induced protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *parasitology* 2007;134(10):1339-1346.
5. Cornelissen AWCA, Overdulse JP, ploeg MVD. Determination of nuclear DNA of five Eucoccystis parasites, *Isospora Toxoplasma gondii*, *sarcosistis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E.acervulinia* and *plasmodium berghei*. with special refrence gametogenesis and meiosis in *I.(T) gondii*. *Parasitology* 1984; 88:531-553.

6. Chal JY, Lin A, Shin EH, Donoh M. Laboratory passage and characterization of anisolate of *Toxoplasma gondii* from an ocular patient in Korea. *Korean J parasitol* 2003; 41(3): 137-54.
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual, Second Edition. Plainview. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1989.
8. Henrik VN, Di Cristina M, Beghtto E, Spadoni A, Petersen E and Gargano N. *Toxoplasma gondii*: DNA Vaccination with bradizoite antigen induces protective immunity in mice against oral infection with parasite cysts. *Exp Parasitol* 2006; 112:274-279.
9. Bhopale GM. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Microbiol Infect* 2003; 5: 457-462.
10. Desolme B, Mevelec MN, Gatel BD, Bout D. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine* 2000; 18: 2512-2521.