Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 3:43 IRST on Monday December 11th 2017

دانشور
پزشکی

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

وصول: ۸۸/۶/۲
آخرین اصلاحات: ۸۸/۱۱/۲۸
پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۷

کلونینـــگ و شناســـایی ژن GRA4 توکسوپلاسما گونده‌ای سـویه RH در پلاسمید یوکاریوت بیانی pcDNA3

ناهید ماسبی[۱]، دکتر فاطمه غفاری‌فر[۲*]، دکتـر زهـره شـریفی[۳]، دکتـر عبدالحـسین دلیمی‌اصل[٤] و حسین وزینی‌قیصر[٥]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲. دانشیار گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. استادیار گروه ویروس‌شناسی سازمان انتقال خون
٤. استاد گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۵. دانشجوی دکترا گروه انگل‌شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

نویسنده مسئول: دکتر فاطمه غفاری‌فر Email: ghafarif@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: توکسوپلاسموزیس به‌وسـیله یـک انگـل تـک‌یاختـه داخـل سـلولی (توکسوپلاسما گونده‌ای) ایجاد می‌شود و در سراسر جهان گسترش دارد. این بیماری دارای اهمیت عمده پزشـکی و دامپزشکی است و عامل بیماری مادرزادی در انسان و حیوانات اهلی است. علاوه بر ایـن، بـه‌تـازگی به‌دلیل آنسفالیت در افراد ایدزی به اهمیت آن افزوده شده است. به همین دلیل تهیه یک واکسن مـؤثر علیه توکسوپلاسما یک هدف مهم در جهان است. آنتی‌ژن گرانولی 4 (GRA4) به‌عنـوان یـک آنتـی‌ژن عمده توکسوپلاسما گونده‌ای شناخته شده است. از این‌رو، به‌عنوان یک کاندیـدا بـرای تهیـه واکسن ملاحظه شده است. آنتی‌ژن گرانولی 4 از برادی‌زوئیت‌ها و تاکی‌زوئیت‌هـا ترشـح مـی‌شـود. ایـن ژن به‌صورت کپی تک و فاقد اینترون است. هدف از این تحقیق، تهیه پلاسمید نوترکیب 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 کلـون شد. سپس در باکتری اشرشیاکلی سوش TG1 ترانسفورم شـد. پلاسـمید نوترکیـب پـس از تکثیـر از باکتری میزبان استخراج و ژن هدف بـا اسـتفاده از بـرش آنزیمـی، بـا آنـزیم‌هـای KpnI و EcoRI از پلاسمید pTZ57R جدا شد. از طـرف دیگـر پلاسـمید pcDNA3 بـرای پـذیرش قطعـه GRA4 و انجـام کلونینگ نیز با آنزیم‌های KpnI و EcoRI برش داده شد. GRA4 درون پلاسمید pcDNA3 سـاب‌کلـون شد و این محصول واکـنش اتـصال در بـاکتری‌هـای فـوق ترانـسفورم شـده و در محـیط LB حـاوی آمپی‌سیلین کشت داده شدند؛ پلاسمیدهای نوترکیب pcGRA4 بـه‌وسـیله کیـت اسـتخراج پلاسـمید، از اشرشیاکلی تخلیص شدند.

نتایج: صحت کار با روش‌های PCR و برش آنزیمی به کمک آنزیم‌های اختصاصی فوق با اسـتفاده از الکتروفورز تأیید شده و نتایج نشان داد، قطعه GRA4 در پلاسمید pcDNA3 کلون‌شده اسـت و بانـد حدود ۱۰۵۸ جفت بازروی ژل آگاروز ایجادشده بود که هم‌اندازه ژن GRA4 توکسوپلاسما گونـده‌ای است و تأیید نهایی با استفاده از توالی‌یابی انجام شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل نشان داد، کلونینگ و ترانـسفورم قطعـه GRA4 در پلاسـمید pcDNA3 بـا موفقیت انجام شده است.

واژگان کلیدی: توکسوپلاسما گونده‌ای، کلونینگ، GRA4، pcDNA3

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 3:43 IRST on Monday December 11th 2017

مقدمه

توکسوپلاسموزیس یکی از معمول‌ترین بیماری‌های انگلی با گسترش جهانی است. عامل آن، توکسوپلاسما گونده‌ای، یک تک‌یاخته چندمیزبانه اختیاری است [۱]. این تک‌یاخته قادر است تمام پستانداران از جمله انسان را آلوده کرده و باعث توکسوپلاسموزیس شود و این طیف وسیع میزبانی آن را به یکی از موفق‌ترین انگل‌های تک‌یاخته‌ای تبدیل کرده است. به‌دلیل اهمیت برای سلامت عموم و شرایط اقتصادی تهیه یک واکسن مؤثر علیه توکسوپلاسما 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 ساب یونیت، نوترکیب و واکسن‌های DNA انجام می‌شود، اما آن‌ها محافظت کامل علیه توکسوپلاسما گونده‌ای ایجاد نمی‌کنند [۳]. از جمله کاندیداهای واکسن، آنتی‌ژن‌های گرانولی (Granular Antigens) (GRAs) هستند. *GRA4* به‌عنوان یک آنتی‌ژن عمده توکسوپلاسما گونده‌ای شناخته شده و از این‌رو، به‌عنوان یک کاندیدا برای تهیه واکسن ملاحظه شده است [٤]. هدف از این مطالعه، کلون کردن قطعه *GRA4* در پلاسمید یوکاریوت بیانی pcDNA3 و ترانسفورم این پلاسمید نوترکیب، در باکتری Ecoli 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 توکسوپلاسما

برای این مطالعه ابتدا مایع صفاقی حاوی ۳۰-۲۰ تاکی‌زوئیت زنده توکسوپلاسما گونده‌ای به‌طور داخل صفاقی به موش BALB/c ماده تلقیح و پس از گذشت ۳ روز، مایع صفاقی موش‌های آلوده به‌وسیله سرنگ‌ها جمع‌آوری شد [٦].

استخراج DNA (DNA Extraction)

استخراج DNA به روش فنل و کلروفرم انجام شد. به‌این‌ترتیب که ۱۰۰میکرولیتر (حدود ۵×۱۰^{۷}) از تاکی‌زوئیت‌های تغلیظ‌شده و شست‌وشوشده 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 ۵۵ °C قرار داده شد [۷].

طراحی پرایمرها

به‌منظور طراحی پرایمرهای Forward (رفت) و Reverse (برگشت)، ابتدا توالی DNA ژن کدکننده آنتی‌ژن گرانولی ٤ (*GRA4*) از اطلاعات بانک ژنی از سایت اینترنتی http//www.ncbi.com با شماره EU660037 به‌دست آمد.

acgaattctacaatgcagggcacttggttttctttatttgtcgtcgtcatggtgtcgcat
cttgcgtgtggaggtgagtgcagctttggttctcacctcgcagatatggcgggcct
ctcggggcggcatgacaaagaacgccatcaggcgaaaaagagatactaccact
cgatgtacggaaccaaactccgtatccctacgcaaatggacagcaggcctctcca
cctcctcagggacagctacttattatccaaaaccctgatggatctttcatgatcgtag
accaacaaggcgtcccgcaggtgccccaggcggcgggaggcccgggttctcc
catgaatggcggttactacatgcctacaggtgtctacactgcacaagtcgttccag
gaacacctggtcaccccgtacaggcgattccgcagcagcctcttcgcacacaag
caacggccacctattatcacccggcagcagttcctcctcccggtccttcagtttttgt
cttcaccccatcctctgttcaaccgggtgcggaggtgactcccggttattctggtct
gcagttgagacaacagtctcaatacggttacagctatccaggtactacttctactcc
cacgcctccaccaccagcgtcgtacggctacccagtgtttccggcatttccacgg
ctgcccgcgttttctgactcagtttcggtttcaactgaagatagtgggcttacaggc
gtcaaagactcgtcatcctctgaatccacggtcacgccggcagacgaagctgctt
cggagtccgaagagggagacaagacaagcaggaaatctaaggtcaagaaggg
aatcctgacggggttaggggtagcagcaacgctggcagcagcagcggccgcc
gcaaaggctgtcaagggatttggtggcacccgcgcttccacggcgcctgctgag
gctggaaaaacggagttggacgacggatatcgcccgcccccattcaacccgcg
accctcaccctacgccgagttattgaaggatttggaaagaatgcgcaaagagaatt
cgt

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

(*Gra4*-F, 5'-CGCG**GGTACC**ATGCAGGGCACTTGGTTTTC-3')

↑

۳۰ جفت باز محل اثر آنزیم KpnI

(*Gra4*-R, 5'-CGCG**GAATTC**TCACTCTTTGCGCATTCTTT-3')

↑

۳۰ جفت باز محل اثر آنزیم EcoRI

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 3:43 IRST on Monday December 11th 2017

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	۲/۵µl
۵۰mM $MgCl_2$	۰/۷۵ µl
۱۰mM dNTP	۰/۵ µl
۱۰Pomol/µ1 primer forward	۱µl
۱۰Pomol/µlprimer Reverse	۱µl
(5u/µl)Taq DNA Polymerase	۰/۵ µl
Extracted DNA	۳µl
ddH_2O	۱۵/۷۵µl

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

مرحله دناتوره شدن ۱ دقیقه در ۹٤ درجه، مرحله اتصال پرایمرها ۳۰ ثانیه در ٦۰ 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_4DNA ligase	۱ – ۵ unit
pTZ57R/T	۳ µl
PCR product	۱۵ µl
PEG	۳ µl
ddH_2O up to	۳۰ µl

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

انتقال پلاسمید کلون‌شده به باکتری مستعد TG1

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

۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد از فریز ۷۰°C- درآورده و به مدت نیم ساعت درون ظرف یخ گذاشته شد. سپس ۱۰-۵ 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 ٤۲°C به مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلافاصله روی یخ قرار گرفت. ۵۰۰ میکرولیتر محیط L.B مایع بدون آنتی‌بیوتیک به مخلوط فوق اضافه و به مدت ٦۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در ۳۷°C قرار داده شد. پس از دریافت DNA خارجی توسط سلول‌ها می‌توان آن‌ها را به‌طور مستقیم کشت داد.

غربال کردن کلونی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب

برای بررسی وجود یا عدم وجود قطعه موردنظر، این باکتری‌ها در محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین، سوبسترای X-gal (۵- برمو ٤- کلرو ۳- ایندولیل β-D گالاکتوپیرانوزید) و IPTG به روش زیر کشت داده شدند:

مقدار ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر سلول‌های ترانسفورم‌شده 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 (۱۸h-۱٦) در ۳۷°C انکوبه شد. سپس به مدت چندین ساعت در دمای ٤°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 استخراج‌شده 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 (به‌دلیل وجود قطعه کلون‌شده در آن) سنگین‌تر از پلاسمیدهای موجود در کلنی‌های آبی هستند [۷].

تکنیک PCR برای تأیید کلونینگ

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

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 3:43 IRST on Monday December 11th 2017

میکرولیتر پلاسمید استخراج‌شده از کلنی‌های سفید، به‌عنوان الگو انجام شد.

تعیین توالی مولکولی DNA

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

ساب‌کلون ژن *GRA4* در پلاسمید بیانیpcDNA3

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

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

براساس دستورالعمل کیت شرکت Fermentas واکنش آنزیمی به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب pT*GRA4*، 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 ۳۷°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 اگاروز 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 T_4DNA ligase، ۳ میکرولیتر بافر و ۵ میکرولیتر آب مقطر تهیه و به‌طور شبانه در بن‌ماری ۱۶°C-۱۴ انجام شد.

انتقال پلاسمیدهای کلون‌شده داخل ناقل TG1

انتقال پلاسمیدهای کلون‌شده pc*GRA4* داخل ناقل TG1 براساس دستورالعمل گفته‌شده در قسمت بالا انجام شد.

غربال کردن کلونی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pc*GRA4*

مقدار ۲۵۰-۲۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های ترانسفورم‌شده را روی پلیت LB حاوی آنتی‌بیوتیک (آمپی‌سیلین) ریخته و با میله شیشه‌ای روی محیط جامد پخش و به‌طور شبانه در ۳۷°C انکوبه شد. تنها باکتری‌هایی که پلاسمید را دریافت کرده بودند قادر بودند روی محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین رشد کنند [۷].

روش‌های تأییدکننده کلون‌شدن قطعه *GRA4* در پلاسمید بیانی pcDNA3

مقایسه باند پلاسمیدهای pcDNA3 و pc*GRA4*

محصول استخراج پلاسمیدهای pcDNA3 و pc*GRA4* روی ژل آگاروز ۱ درصد لود و الکتروفورز شد.

PCR ژن *GRA4* با استفاده از پلاسمید نوترکیب pc*GRA4* به‌عنوان الگو

واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با شرایط مذکور در قسمت بالا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و ۳ میکرولیتر پلاسمید pc*GRA4*، به‌عنوان الگو انجام شد.

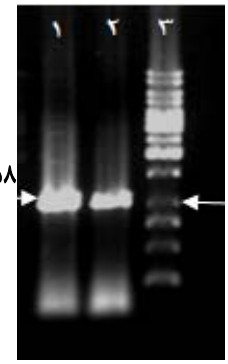
برش پلاسمید نوترکیب pc*GRA4* با آنزیم‌های EcoRI و KpnI

برش آنزیمی به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب pc*GRA4*، 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

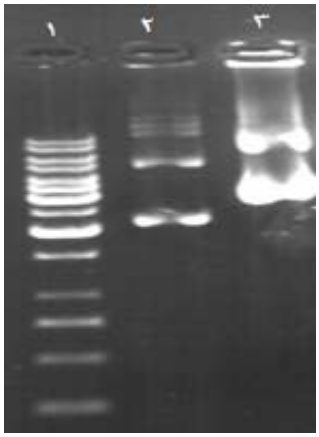
نتایج حاصل از واکنش PCR با DNA ژنومی نشان داد، فقط یک باند حدود ۱۰۵۸ جفت باز روی ژل آگاروز ایجاد شده بود که هم‌اندازه ژن *GRA4* توکسوپلاسما گونده‌ای است و هیچ ژن دیگری غیر از آن تکثیر نشده بود؛ بنابراین پرایمرهای طراحی‌شده برای تکثیر ژن*GRA4* اختصاصی بودند (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصول استخراج DNA ژنومی روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد، ستون شماره ۱و۲ قطعه *GRA4* اندازه ۱۰۵۸ جفت باز، ستون ۳ ماکر ۱۰۰۰ جفت باز

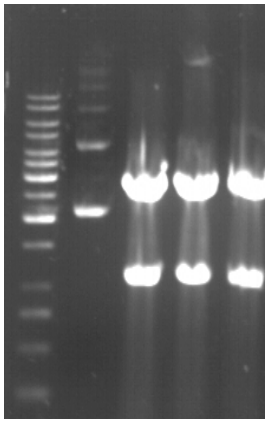
مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی‌های سفید و آبی

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 به‌دلیل 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 ۱۰۰۰جفت باز، ستون ۲ پلاسمید pTZ57R، ستون ۳ پلاسمید نوترکیب pT*GRA4*

برش آنزیمی پلاسمیدهای pT*GRA4* دو باند نشان داد؛ یک باند ۱۰۵۸جفت باز که هم‌اندازه ژن *GRA4* توکسوپلاسما گونده‌ای و باند دیگر تقریباً هم‌اندازه pTZ57R 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 نوترکیب pT*GRA4* روی ژل آگاروز ۱ درصد، ستون ۱ مارکر۱۰۰۰ جفت بازی، ستون ۲ پلاسمید pT*GRA4* آنزیم نخورده، ستون‌های ۳-۵ پلاسمید pT*GRA4* آنزیم خورده و قطعه ۱۰۵۸جفت بازی از آن جدا شده است.

نتایج تعیین توالی

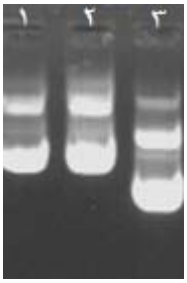
نتایج حاصل از تعیین توالی ژن *GRA4* در پلاسمید pTZ57R نشان داد که این ژن با ژن *GRA4* توکسوپلاسما گونده‌ای دارای شماره EU660037 در بانک ژنی حدود ۹۸ درصد تشابه داشت.

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 pc*GRA4* و pcDNA3 استخراج شده از باکتری‌های ترانسفورم شده روی ژل آگاروز سه باند نشان دادند و pc*GRA4* در مقایسه با pcDNA3 مقداری بالاتر بود که تأییدکننده کلون قطعه *GRA4* در پلاسمید pcDNA3 بود (شکل ٤).

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 3:43 IRST on Monday December 11th 2017

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 3:43 IRST on Monday December 11th 2017



شکل ٤. نتایج الکتروفورز مقایسه باند pcDNA3 و pc*GRA4* روی ژل آگاروز ۱ درصد، ستون ۱ و ۲ پلاسمید pc*GRA4*، ستون ۳ پلاسمید pcDNA3

نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pc*GRA4*

نتایج برش آنزیمی pc*GRA4* با آنزیم‌های EcoRI و KpnI دو باند نشان داد که یکی حدود ٥٤٠٠ جفت باز بود و باند دیگر حدود ۱۰۵۸جفت باز که برابر با قطعه *GRA4* است و ساب‌کلون قطعه *GRA4* درون pcDNA3 تأیید شد (شکل ٥).

نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR پلاسمید pc*GRA4*، با پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده تنها یک باند را نشان داد که هم‌اندازه قطعه *GRA4* بود، بنابرین ژن *GRA4* از پلاسمید pc*GRA4* به‌عنوان الگو استفاده کرده و تکثیر شده بود، اما در نتایج حاصل از PCR پلاسمید pcDNA3 هیچ باندی نشان داده نشد (شکل ٦).

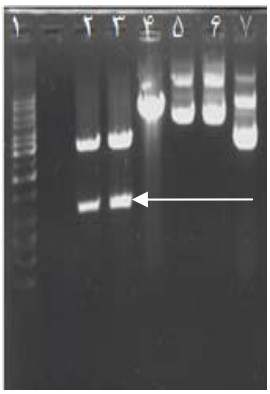
بحث

توکسوپلاسما گونده‌ای یک انگل تک‌یاخته‌ای داخل سلولی است که باعث مرگ و میر و ناخوشی در افراد دارای نقص ایمنی و عفونت‌های مادرزادی می‌شود [٨].

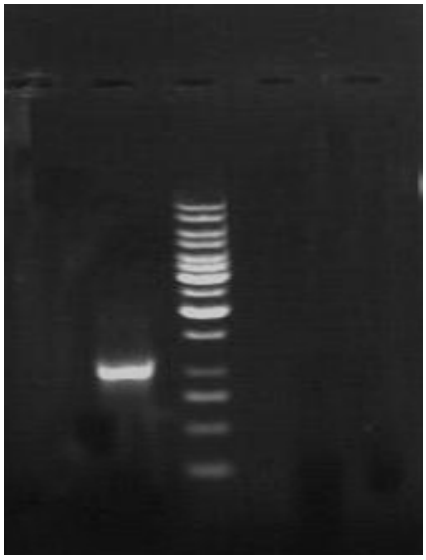
واکسیناسیون DNA روش قدرتمندی برای القای پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال است که با تزریق پلاسمید DNA برهنه به داخل میزبان، سلول‌های میزبان پروتئین کدشده را بیان می‌کنند [٩].

واکسن‌هایی که به‌طور تجاری در دسترس هستند، به‌طور عمده واکسن‌های زنده ضعیف‌شده یا واکسن‌های نوترکیب‌یافته هستند[٦]. در سال‌های اخیر، فناوری پیشرفته واکسیناسیون DNA آینده خوبی را برای توسعه و ایجاد واکسن‌های چندظرفیتی ارائه کرده است [٦].

از جمله کاندیداهای واکسن، آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی هستند. *GRA4* به‌عنوان یک آنتی‌ژن عمده توکسوپلاسما گونده‌ای شناخته شده و از این‌رو، به‌عنوان یک کاندیدا برای تهیه واکسن ملاحظه شده است [٤].



شکل ٥. نتایج برش آنزیمی پلاسمید pc*GRA4* و pcDNA3 روی ژل آگاروز ۱ درصد، ستون ۱ مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، ستون ۳ و ۲ پلاسمید نوترکیب pc*GRA4* برش‌خورده، ستون ٤ پلاسمید pcDNA3 برش‌خورده، ستون ٥ و ٦ pc*GRA4* برش‌نخورده، ستون ۷ پلاسمید pcDNA3 برش‌نخورده



شکل ۶. الکتروفورز محصول PCR به کمک پلاسمید pc*GRA4* به‌عنوان الگو روی ژل اگاروز ۱ درصد، ستون ۱ پلاسمید pcDNA3، ستون ۲ محصول PCR (۱۰۵۸ جفت باز)، ستون ۳ مارکر ۱۰۰۰ جفت باز

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 3:43 IRST on Monday December 11th 2017

ژانگ و همکاران در سال ۲۰۰۷ و برای ارزیابی ایمنی‌زایی علیه توکسوپلاسما، پلاسمید نوترکیب 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 ٤ و به مقدار بسیار بالایی اینترفرون گاما تولید شد و موش‌هایی که با دوز کشنده توکسوپلاسما گونده‌ای چالش شدند، به‌طور کامل زنده ماندند. علاوه بر این، تشکیل کیست در موش‌های ایمن‌شده با رژیم اولیه و تقویت‌کننده هترولوگ مهار شد [٤].

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 P*GRA4* باعث می‌شود ٦٢ درصد از موش‌های آلوده C57BL/6 زنده بمانند [۱۰].

در این تحقیق، آنالیز تعیین توالی ژن *GRA4* توکسوپلاسما گونده‌ای 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 اینترونی در ژن موردنظر وجود ندارد. همچنین این ژن با سویه RH توکسوپلاسماگونده‌ای دارای شماره EU660037 در بانک ژنی دارای ۹۸ درصد تشابه است و این شباهت نشان‌دهنده حفظ توالی ژن در سویه‌های مختلف توکسوپلاسما گونده‌ای است. در روش برش آنزیمی قطعه ۱۰۵۸ جفت بازی جدا شد که هم‌اندازه ژن *GRA4* توکسوپلاسماگونده‌ای بوده و در حقیقت ساب‌کلون این ژن را در پلاسمید pcDNA3 تأیید می‌کرد. نتایج حاصل از PCR پلاسمید pT*GRA4* و pc*GRA4* نشان داد، تنها ژن *GRA4* تکثیر شده و هیچ ژن دیگری تکثیر نشده است. پس این نتایج تأیید می‌کرد آغازگرهای طراحی‌شده 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 نوترکیب 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.

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 hetrologous 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, Overdulve 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 inI.(T) gondii. *Parasitology* 1984: 88:531-553.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 3:43 IRST on Monday December 11th 2017

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 Infec* 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.