

Cloning and sequencing the plasmid encoding dense granule antigen 14 (GRA14) of Toxoplasma gondii RH strain

Ehsan Ahmadpour¹,
Shahabeddin Sarvi²,
Ahmad Daryani³,
Mehdi Sharif³,
Mohammad-Bagher Hashemi Soteh⁴,
Azadeh Mizani¹,
Kian Rezaee⁵

¹ PhD Student, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² PhD, Assistant Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD, Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ PhD, Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Msc Student, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received December 25, 2013; Accepted April 30, 2014)

Abstract

Background and purpose: Toxoplasmosis is a common parasitic disease throughout the world and one-third of the population has antibodies to *Toxoplasma gondii*. This disease causes serious medical problems in fetuses and immunocompromised individuals. As gene encoding protein GRA14 can be considered as a suitable target for DNA vaccine and designing diagnostic kits; the aim of this study was to do cloning and sequencing the gene encoding GRA14 protein of *Toxoplasma gondii* RH strain.

Materials and methods: DNA extraction was performed on harvested tachyzoites from mouse peritoneal fluid, then PCR carried out and amplification products were analyzed by gel electrophoresis. GRA14 gene was cloned in pTG19-T as a cloning vector, then recombinant plasmid confirmed by the colony-PCR and restriction enzyme digestion using HindIII and EcoRI, followed by sequencing.

Results: Evaluation of PCR products by agarose gel electrophoresis and analysis of nucleotide sequencing of 1227 bp gene encoding the protein GRA14, revealed the complete homology with the recorded sequences in the gene bank. Furthermore, cloning of GRA14 gene in pTG19-T vector was confirmed with colony PCR and restriction enzyme digestion.

Conclusion: The results showed that the GRA14 gene was successfully cloned into the pTG19-T vector and this plasmid can be used to design DNA vaccines and diagnostic kits in further studies.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, dense granule antigen 14, cloning

کلونینگ و توالی‌یابی پلاسمید کد کننده پروتئین گرانولی متراکم ۱۴ سویه RH توکسوپلازما گوندیی

احسان احمدپور^۱
شهاب‌الدین سروی^۲
احمد دریانی^۳
مهدی شریف^۳
محمد باقر هاشمی^۴
آزاده میزانی^۱
کیان رضایی^۵

چکیده

سابقه و هدف: بیماری توکسوپلاسموز از بیماری‌های شایع در جهان می‌باشد که حدود یک سوم مردم دارای آنتی‌بادی بر علیه توکسوپلازما هستند. این بیماری بیشتر به دلیل عوارض وخیم آن، در موارد مادرزادی و نیز بیماران نقص سیستم ایمنی اهمیت دارد. ژن کد کننده پروتئین ۱۴ GRA می‌تواند به عنوان یک هدف مناسب جهت ساخت DNA (Deoxyribonucleic acid) واکسن و همچنین طراحی کیت تشخیصی مورد ارزیابی قرار گیرد. هدف از این بررسی، شناسایی و کلون کردن ژن کد کننده پروتئین ۱۴ GRA سویه RH توکسوپلازما گوندیی بود.

مواد و روش‌ها: در مرحله اول پس از جداسازی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما از مایع صفاقی موش آلوده، DNA آن استخراج شد و پس از انجام PCR (Polymerase chain reaction)، محصول تکثیر شده بر روی ژل الکتروفورز بررسی گردید. سپس ژن حاصل در وکتور pTG19-T کلون گردید. جهت تأیید از روش‌های Colony-PCR و هضم آنزیمی به وسیله آنزیم‌های محدود کننده HindIII و EcoRI استفاده شد. در نهایت ژن ۱۴ GRA کلون شده در وکتور pTG19-T مورد تعیین توالی قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی واکنش PCR بر روی ژل الکتروفورز و همچنین تعیین توالی ژن کد کننده پروتئین ۱۴ GRA نشان داد که این ژن ۱۲۲۷ جفت بازی با ژن ۱۴ GRA سویه RH ثبت شده در ژن بانک تشابه کامل داشت. علاوه بر این، با استفاده از روش‌های هضم آنزیمی و Colony PCR کلون شدن، ژن ۱۴ GRA در پلاسمید pTG19-T مورد تأیید قرار گرفت.

استنتاج: ژن ۱۴ GRA به طور موفقیت آمیزی در پلاسمید pTG19-T کلون شد و این پلاسمید می‌تواند برای مطالعات بعدی جهت ساخت واکسن DNA و طراحی کیت تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلازما گوندیی، ۱۴ GRA، کلونینگ

مقدمه

آن با موجودات مختلف، کنترل و پیشگیری آن را در عمل دشوار کرده است (۴-۱). آلودگی در افراد دارای ایمنی کامل اغلب بدون علامت است؛ اما در نوزادان و افراد مبتلا به نقص

توکسوپلازما گوندیی یک تک‌یاخته داخل سلولی اجباری است که طیف وسیعی از مهره‌داران را آلوده می‌کند و سازگاری

E-mail: shahabesarvi@yahoo.com

مؤلف مسئول: شهاب‌الدین سروی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی

۱. دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۲. استادیار، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۳. استاد، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۴. دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
 ۵. دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۱۲/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۲/۱۰

اکتسابی سیستم ایمنی، عوارض شدیدی همچون میکروسفالی، هیدروسفالی، کوریورینیت (در نوزادان) و آنسفالیت (در افراد مبتلا به نقص اکتسابی سیستم ایمنی) را ایجاد می کند که حتی ممکن است باعث مرگ بیمار شود (۵-۷).

در حال حاضر، بررسی ها به سمت شناخت آنتی ژن های ایمنوژن و محافظت کننده توکسوپلازما گوندی سوق یافته است؛ زیرا با تشخیص این آنتی ژن ها می توان با تولید پپتیدهای مصنوعی و تولید منوکلونال آنتی بادی محافظت ایجاد کرد. آنتی ژن های دفعی - ترشحی تاکی زوئیت توکسوپلازما، به شدت ایمنوژن هستند و بررسی های مختلف در مدل موشی نشان داده است که شیوه تهیه آنتی ژن دفعی - ترشحی، محل و دوز تزریقی آنتی ژن، نوع ادجوانت و استفاده یا عدم استفاده از سرم جنین گاو (FBS یا Fetal bovine serum) در محیط کشت انگل، در ایمنی زایی این آنتی ژن ها تأثیر گذار می باشند (۶، ۸).

آنتی ژن های دفعی - ترشحی شامل سه دسته پروتئین های ترشحی میکرونم ها (MIC یا Microneme proteins)، راپتری ها (ROP یا Roperty proteins) و پروتئین های گرانولی متراکم (GRA یا Dense granule antigen) هستند، که هر سه نوع آنتی ژن دفعی - ترشحی پیش گفته، در تحریک پاسخ های ایمنی نقش دارند (۹، ۱۰).

پروتئین های گرانولی متراکم در حین یا بعد از تهاجم انگل توکسوپلازما گوندی به سلول میزبان، به داخل حفره پارازیتوفوروس آگروسیتوز می شوند (۱۰). این پروتئین ها، محیط حفره پارازیتوفوروس را به نفع انگل تغییر می دهند و پایدار می کنند و باعث زنده ماندن و تکثیر تاکی زوئیت های انگل طی دوره درون سلولی می شوند (۹، ۱۰). تاکنون چندین پروتئین گرانولی متراکم شناخته شده و بررسی های متعددی روی برخی از آن ها صورت گرفته است و در این میان، GRA۷ (۲۹kD)، GRA۴ (۲۳kD) و GRA۱ (۴۰kD) ایمنی زایی نسبی خوبی نشان داده اند (۱۰، ۳).

یکی از جدیدترین پروتئین های گرانولی شناخته شده توکسوپلازما گوندی، GRA۱۴ می باشد که مطالعات اندکی روی آن انجام شده و نقش ساختاری و توپولوژی خاص این

پروتئین تا حدودی مشخص شده است (۱۱). البته در سال های اخیر در تک یاخته نئوسپورا کانینوم نیز که هم خانواده توکسوپلازما گوندی است و در نشخوار کنندگان باعث سقط جنین می گردد، پروتئین های گرانولی متراکمی به نام GRA۱۴ شناسایی شده است (۱۲). این پروتئین که شامل ۴۰۹ اسید آمینه است، دارای توپولوژی خاصی می باشد؛ به طوری که انتهای کربوکسیل آن در سیتوپلاسم سلول میزبان و انتهای آمین آن در حفره پارازیتوفوروس قرار می گیرد. با توجه به الگوی خاص این پروتئین و وفور آن در سیستم PVM (Parasitophorus vacuole membrane) و (Intravacuolar network) دور از انتظار نیست که این پروتئین محرک قوی برای سیستم ایمنی باشد (۱۱).

درمان این بیماری به دلیل عوارض جانبی متعدد داروهای در دسترس مشکل است و عفونت مجدد به سرعت اتفاق می افتد. در شرایط حاضر، تولید و توسعه داروهای جدید ضد توکسوپلازما یا یک واکسن، جایگزین بسیار مناسبی برای پیشگیری از عفونت خواهد بود (۵-۷).

با توجه به اهمیت این انگل در ایجاد بیماری توکسوپلاسموز مادرزادی و همچنین عفونت فرصت طلب در افراد دارای نقص سیستم ایمنی و نیز نقش مؤثر واکسیناسیون در پیشگیری از آن و این که هیچ گونه مطالعه ای در خصوص کلونینگ ژن کد کننده GRA۱۴ در دنیا انجام نشده است، هدف از این پژوهش، شناسایی و کلون کردن ژن کد کننده این پروتئین در سویه RH توکسوپلازما گوندی برای اولین بار در ایران بود. نتایج حاصل از این مطالعه می تواند در تهیه DNA (Deoxyribonucleic acid) واکسن و نیز طراحی کیت تشخیصی توکسوپلاسموز مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

تکثیر انگل و استخراج DNA

در این مطالعه از تاکی زوئیت های سوش استاندارد RH توکسوپلازما گوندی نگهداری شده در دانشکده پزشکی ساری استفاده گردید. به منظور تکثیر انگل، ابتدا به هر موش سوری

جدول شماره ۱: آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده برای تکثیر ژن GRA14 توکسوپلازما گوندی به همراه توالی‌های برش آنزیمی (زیر محل اثر آنزیم خط کشیده شده است)

آغازگر رفت (Forward)	AAAAAG↓CTTATGCGAGGCGATAGCG (Hind III)
آغازگر برگشت (Reverse)	AAAGAA↓TTCCTATTGCGTTGGTCTCTGGTA (EcoR I)

درجه سانتی گراد، مرحله واسرشتگی (Denaturation) به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال آغازگرها (Annealing) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سانتی گراد، مرحله گسترش (Extension) به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله گسترش نهایی (Final extention) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد.

در نهایت، جهت تأیید انجام واکنش، محصول PCR بر روی ژل ۱ درصد آگارز در کنار نشانگر ۱۰۰ bp الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز و مشاهده قطعه ژنی GRA14، طبق پروتکل کیت استخراج از ژل شرکت بیونر کره (Bioneer, AccuPrep® Gel Purification Kit, ۳۰۳۵-۱) جدا گردید. جهت تأیید فرایند استخراج از ژل، ۳ میکرولیتر از محصول این مرحله بار دیگر روی ژل ۱ درصد الکتروفورز شد.

کلونینگ ژن GRA14 در پلاسمید pTG19-T و انتقال آن به باکتری مستعد Ecoli سوش Top10

در این مطالعه به منظور انجام کلونینگ از کیت PCR T- cloning vector شرکت Vivantis استفاده شد. جهت انجام این کار در یک میکروتیوپ ۰/۵ میلی لیتری، واکنشی به حجم ۳۰ میکرولیتر به شرح جدول شماره ۲ تهیه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد و سپس به صورت شبانه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه گردید.

پس از انجام واکنش فوق جهت پذیرش (Transformation) پلاسمید حاوی ژن GRA14، از باکتری Ecoli (Escherichia coli) سوش Top10 مستعد شده به روش کلرید کلسیم استفاده شد (۱۳). پس از مستعد کردن

سفید تعداد $10^6 \times 8-5$ تاکی زوئیت به صورت داخل صفافی تزریق شد و پس از ۴-۳ روز، مایع صفاق موش آسپیره شد و برای رسوب دادن انگل‌ها، لوله آزمایش حاوی تاکی زوئیت‌ها در ۸۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید (۳، ۸). استخراج DNA تاکی زوئیت‌ها بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA (۳۰۳۲) Bioneer, AccuPrep® Genomic DNA extraction kit, Cat. No.: K انجام شد. غلظت و کیفیت DNA به دست آمده با دو روش جذب نوری و الکتروفورز بررسی شد.

طراحی پرایمرها

جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز یا PCR (Polymerase chain reaction) ابتدا آغازگرهای (Primer) رفت (Forward) و برگشت (Reverse) با استفاده از اطلاعات تنها توالی ثبت شده در سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> به شماره FJ015061/1 توسط نرم‌افزار Gene runner طراحی گردید (جدول شماره ۱). پس از طراحی آغازگرها جهت انجام برش آنزیمی، به ابتدای آغازگر رفت و برگشت به ترتیب، توالی‌هایی به عنوان Linker اضافه شد که حاوی جایگاه برش آنزیم‌های برش Hind III و EcoR I باشد.

تکثیر و جداسازی ژن GRA14 توکسوپلازما گوندی با روش PCR

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از PCR master mix های شرکت Bioneer کره (Cat No:K-2012) استفاده شد و تکثیر ژن GRA14 در ۳۵ سیکل طبق برنامه به شرح زیر انجام شد: مرحله واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴

استفاده از PCR Master Mix های شرکت Bioneer واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد و سپس محصول به دست آمده در ژل ۱ درصد آگارز الکتروفورز گردید تا وجود قطعه کلون شده مورد نظر تأیید گردد.

۳- استفاده از برش آنزیمی DNA پلاسمیدی:

جهت برش آنزیمی و جداسازی قطعه مورد نظر از پلاسمید نوترکیب در ابتدا باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط LB مایع کشت داده شد و سپس با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (۳۰۳۰-۱) AccuPrep® Plasmid Mini Extraction شرکت Bioneer (Kit, Cat. No.: K) پلاسمید از باکتری استخراج شد. به منظور برش آنزیمی به صورت Double digestion، از دو آنزیم EcoR I و Hind III شرکت Fermentas آلمان، در یک میکروتیوپ استریل در حجم نهایی ۴۰ میکرولیتر استفاده شد. محلول واکنش شامل ۲۵ میکرولیتر DNA پلاسمیدی، بافر ۱۰X به میزان ۸ میکرولیتر، از هر یک از آنزیم‌ها ۱ میکرولیتر و در نهایت ۵ میکرولیتر آب مقطر بود. سپس میکروتیوپ، به مدت ۱۶ ساعت (Overnight) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در نهایت، ۵ میکرولیتر از محصول برش آنزیمی روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد.

۴- تعیین توالی ژن ۱۴ GRA کلون شده:

برای تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن ۱۴ GRA کلون شده، محصول حاصل از برش آنزیمی با استفاده از کیت استخراج از ژل (۳۰۳۵-۱) AccuPrep® Gel Purification شرکت Bioneer (Kit, Cat. No.: K) استخراج و تخلیص شد و جهت تعیین توالی به شرکت فزایوتک ارسال شد. نتیجه تعیین توالی ژن کلون شده با استفاده از سایت اینترنتی www.ncbi/blast نظر تشابهات و اختلافات با ژن ۱۴ GRA توکسوپلازما گوندی موجود در بانک جهانی ژن مقایسه گردید.

یافته‌ها

در مرحله اول، کار استخراج DNA انجام شد و جهت تأیید، محصول استخراج روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز

باکتری‌ها برای پذیرش پلاسمید، ۱۰ میکرولیتر از پلاسمیدهای حاوی ژن مورد نظر به میکروتیوپ حاوی باکتری مستعد شده اضافه گردید و در نهایت با استفاده از شوک حرارتی پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری منتقل شد.

جدول شماره ۲. مواد و مقادیر هر یک در واکنش انجام کلونینگ

ماده	مقدار
PCR product	۵ μl
Vector	۳ μl
۵x Ligation buffer	۶ μl
T ₄ DNA Ligase	۱ μl
Nuclease-free water	۱۵ μl
Total	۳۰ μl

سپس این باکتری‌ها ابتدا به مدت ۶۰ دقیقه داخل انکوباتور شیکردار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محیط کشت LB (Luria bertani) مایع فاقد آنتی‌بیوتیک کشت داده شد و پس از آن این محیط کشت در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ گردید. از رسوب باقی‌مانده به پلیت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، X-gal (۳-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside) و IPTG (۵-bromo-۴-chloro-thiogalactopyranoside) (Isopropyl β-D-۱) اضافه شد و به کمک میله شیشه‌ای L شکل در تمام نقاط پلیت پخش گردید و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

پس از انجام کلونینگ و انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری، جهت تأیید کلونینگ ژن از روش‌های زیر استفاده شد:

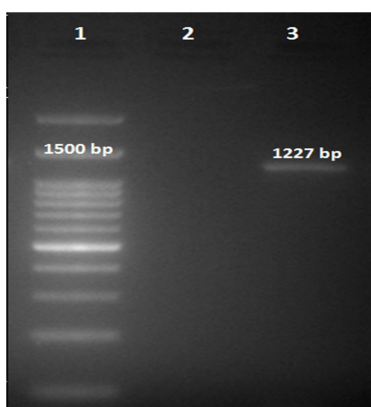
۱- تشکیل کلونی‌های آبی و سفید:

پس از کشت باکتری‌های ترانسفورم شده، در سطح محیط کشت، کلنی‌های آبی (کلنی فاقد پلاسمید نوترکیب که به دلیل سنتز بتا‌گالاکتوزیداز و تجزیه X-gal و تولید Indolyl به رنگ آبی دیده می‌شود) و سفید (کلنی حاوی پلاسمید نوترکیب) را تشکیل خواهد شد.

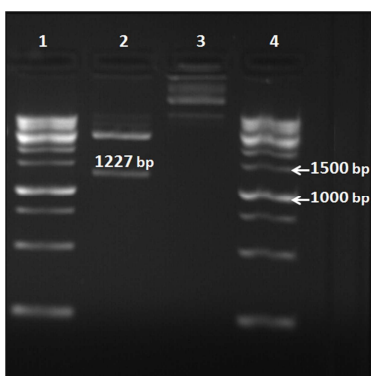
۲- انجام Colony PCR از کلنی‌های آبی و سفید:

برای این کار ۲-۳ عدد از کلنی‌های آبی و سفید حاصل مرحله ترانسفورم انتخاب (به عنوان جایگزین DNA الگو) و با

پلاسمید استخراج گردید و در نهایت، در معرض آنزیم‌های محدودالانتر EcoRI و HindIII قرار گرفت که در الگوی الکتروفورزی آن دو باند که یکی مربوط به پلاسمید و دیگری بانندی ۱۲۲۷ نوکلئوتیدی که نشان دهنده وجود ژن GRA۱۴ کلون شده می‌باشد، مشاهده گردید (تصویر شماره ۳). در نهایت تعیین توالی ژن مورد نظر و مقایسه آن با ژن ثبت شده در NCBI نشان داد که این توالی با ژن GRA۱۴ توکسوپلازما گوندیبی ثبت شده در بانک جهانی ژن، ۱۰۰ درصد همخوانی دارد (تصویر شماره ۴).

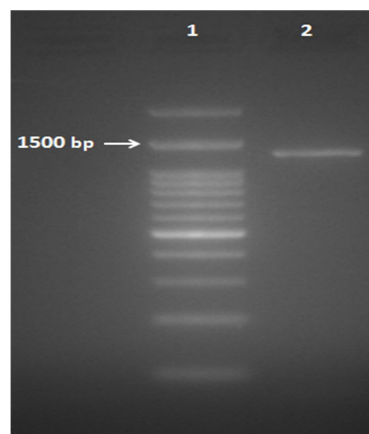


تصویر شماره ۲: الکتروفورز محصول کلونی PCR از کلونی‌های سفید و آبی بر روی ژل آگارز ۱ درصد (ستون ۱: نشاتگر با وزن ملکولی ۱۰۰ bp، ستون ۲: محصول PCR از کلونی آبی فاقد ژن GRA۱۴، ستون ۳: محصول PCR کلونی سفید حاوی قطعه ژنی ۱۲۲۷ جفت بازی ژن GRA۱۴)
PCR: Polymerase chain reaction
GRA۱۴: Dense Granule Antigen 14



تصویر شماره ۳: الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید pTG۱۹-T حاوی ژن GRA۱۴ توکسوپلازما گوندیبی بر روی ژل آگارز ۱ درصد (ستون‌های ۱ و ۴: نشاتگر با وزن ملکولی ۱ kb، ستون ۲: محصول برش آنزیمی شامل قطعه ۱۲۲۷ جفت بازی ژن GRA۱۴ در پایین و پلاسمید در بالا، ستون ۳: پلاسمید حاوی ژن مورد نظر بدون برش آنزیمی)
GRA۱۴: Dense Granule Antigen 14

گردید. غلظت نمونه نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ در حدود ۱۵۱ نانوگرم در میکرولیتر برآورد شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از DNA ژنومی با پرایمرهای طراحی شده برای ژن GRA۱۴ توکسوپلازما، محصول واکنش بر روی ژل ۱ درصد آگارز الکتروفورز شد و بانندی در محدوده ۱۲۲۷ bp مشاهده گردید که نشان دهنده تکثیر اختصاصی ژن کد کننده پروتئین GRA۱۴ می‌باشد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن GRA۱۴ توکسوپلازما گوندیبی بر روی ژل آگارز ۱ درصد (ستون ۱: نشاتگر با وزن ملکولی ۱۰۰ bp، ستون ۲: قطعه ۱۲۲۷ جفت بازی ژن GRA۱۴)
PCR: Polymerase chain reaction
GRA۱۴: Dense Granule Antigen 14

پس از انتقال ژن GRA۱۴ توسط پلاسمید pTG۱۹-T به داخل باکتری Ecoli سویه Top۱۰ به عنوان میزبان و کشت آن بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG، کلونی‌های سفید و آبی تشکیل شد که نشان دهنده انتقال پلاسمید به درون باکتری مورد نظر بود. همچنین جهت تأیید وجود ژن نو ترکیب در پلاسمید pTG۱۹-T از کلونی‌های سفید طبق پروتکل دمایی و زمانی پیش گفته برای PCR اولیه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد و با الکتروفورز محصول واکنش وجود ژن GRA۱۴ تأیید گردید (تصویر شماره ۲). در ادامه پس از تأیید کلون نو ترکیب با PCR، جهت تأیید با روش همضم آنزیمی، کلونی‌های حاوی ژن کشت داده شد و

ATGCAGGCGATAGCGCGGGGGACCGCTCGTCGGGGTGGTTCGAGTTGTAGCTGGCTTTTCTATTTTTTCGTTTCTGCTT
 CTAACGAGTGAAGCAGTGGCTGCAGCTGCCAGTTGGAGCAGACAATTCCTATTCTGTCCAACATCAACCCGAGCAG
 GAAGGCATCCTCGGCACACAGAAACCCAGACTGCCCAACTCCTCAGCAGCTCATTGTGCCCGTAAGCTATCTAGGA
 GATGGTTTTGTCACTTCTCTGGAGTCTTAGGCGTTTACCCCTCGATGTTGCATTGGAACGTTTAACTAGTGCTCGG
 GAAATACCAACTGTGGCAGGTTTTGTCAAAAATATGTGCTGGCGGCCAGCTATCTCGATCCCTTCAGAGCACGGCG
 AACGGCGTGAAGAAGATTCTAATGCGTCTCGATGCAGCCAAAAATGAAGAAGGATTTATAACAGATCTGTTGAAGTCC
 GCTCCTGAGGTTCAAGAAGTCTGAGCCGTTTCTTGGTTCGTTGCGTCTGCACTTGTCTTTTGGACATCAATGGT
 CTCCATGAGGCGGTTGACGCTAGTCTCCCCGTGACAAAAGCAGTGGTCATGCTGTACTTACATCTAGTGAGTGTCTGTA
 CCGCCGAAACAACGGGATCCTTTCTCTCTTCTTTCTTTATCTGCAAGATGCCGTGGGAGAGTTCAAGATCATGGAG
 GACCATGTGCGCTCTGTTGTTGCTGGTGAGGCACAGGAGGAAAATGTTATAAACAGTCAACCACAGGGAACGGAAACG
 TCGCACAGGGCGGTAGTGAGAGGGGGCATAAGAATGCTACAATCTGGGACCTCCGAAACCACGAAGCTGCGGAGGACG
 TGGTGGAGGTTATTTAAAGTGGCTGCTCTCGCCGCTTAACGATGGCACTGTAATAATGTTACGCTCGTCTGTCGC
 GCTTTTCTCGAGAGAAGCGGATGCGCCGAGACGGAGGTGGGGACAGTGGAGACTTTGGAGAAGAGGGGCGCTCAAAA
 GGAGACGTGCAACTTCTGATGATATGCCAGAGAGCCGCCCGCCGCTACTCTCCGCCATGTATCCGTTTCGCCGAT
 CCTGAACACAGATGGGCTGGTACGTACGGAACGTCTCATGGAGTTATCGAGTACAACCAGCAGCTCCACCCGCCCT
 GCGTCTATGCTATATCCGAGTTTACACAGGCTGGGCTACCAGAGACCAAGCGAATAG

تصویر شماره ۴: توالی DNA ژن کد کننده پروتئین GRA۱۴ در سویه RH توکسوپلازما

GRA۱۴:Dense Granule Antigen 14

بحث

دیگر که بر روی ژن‌های مختلف توکسوپلازما انجام شده است، اولین قدم و پایه مطالعات بعدی جهت انجام بیان این ژن و تهیه پروتئین نو ترکیب می‌باشد. در زمینه تهیه واکسن DNA علیه انگل توکسوپلازما گوندی و نیز استفاده از آنتی‌ژن‌های نو ترکیب در طراحی کیت‌های تشخیصی، تحقیقات متعددی در ایران و دنیا انجام شده است؛ اما مطالعه‌ای برای انجام کلون و یا بیان ژن GRA۱۴ انجام نشده است.

کواکب و همکاران، پروتئین P۳۵ انگل توکسوپلازما گوندی را در وکتور pGEM-T کلون نمودند و برای ترانسفورماسیون از سویه LB۲۱ باکتری اشرشیاکلی استفاده نمودند. در این مطالعه، توالی ژن مورد نظر با توالی موجود در بانک جهانی ژن همخوانی ۱۰۰ درصدی را نشان داد (۱۴). بابایی و همکاران، ژن بیان کننده GRA۸ توکسوپلازما گوندی را در پلاسمید pET-۲۸b(+) کلون نمودند و سپس در باکتری Ecoli سویه DH۵α ترانسفورم کردند. توالی این ژن نیز با توالی ژن بانک همخوانی کامل داشت (۱۵).

بابایی و همکاران، پلاسمید کد کننده ژن GRA۵ توکسوپلازما گوندی را در پلاسمید pcDNA۳/۱ کلون نمودند. برای بررسی بیان این ژن از سلول‌های HEK ۲۳۹-T بافت کلیه انسان استفاده شد و با روش وسترن بلات و رنگ آمیزی فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶). همچنین

آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی انگل نقش مهمی در تحریک سیستم ایمنی میزبان دارند؛ به طوری که این نوع از آنتی‌ژن‌ها در عفونت‌های انسانی بسیار ایمنوژن هستند و محرک قوی‌تری نسبت به آنتی‌ژن‌های محلول و کیستی، برای سیستم ایمنی سلولی می‌باشند. همچنین در مقایسه با آنتی‌ژن تام توکسوپلازما، سبب تحریک و تکثیر بیشتر لنفوسیت‌های T می‌شوند. از این رو، آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی به عنوان کاندیدای مناسب برای بررسی‌های ایمنوآسیون پیشنهاد شده‌اند (۸، ۶، ۳). گرانول‌های ترشحی متراکم توکسوپلازما گوندی، اندام‌های ترشحی وزیکولار هستند و پروتئین‌هایی که در تغییر شکل واکوئل پارازیتوفوروس و همچنین غشای این واکوئل در جهت حفظ و بقای انگل، ترشح می‌نمایند. تا کنون تعداد زیادی از گرانول‌های ترشحی متراکم شناسایی شده‌اند که به طور کلی جزء آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی توکسوپلازما می‌باشند (۹، ۱۰، ۱۲).

در مطالعه حاضر ژن گرانول ترشحی متراکم ۱۴ توکسوپلازما گوندی، برای اولین بار در سلول پروکاریوتیک کلون گردید و مشاهده شد که فاقد ناحیه اینترون می‌باشد. آنالیز ژن مورد نظر و مقایسه آن با ژن ثبت شده برای GRA۱۴ توکسوپلازما در بانک ژنی وجود هم‌ژن‌سیتی را در نوکلئوتیدها نشان داد. این مطالعه نیز همانند اکثر مطالعات

برخی از این نظر با مطالعه حاضر دارای تفاوت‌هایی می‌باشند. در این مطالعه از پلاسمید pTG19-T و باکتری Ecoli سویه Top10 استفاده شد و نشان داد که جهت انجام کلون ژن GRA14، پلاسمید و باکتری پیش‌گفته مناسب می‌باشد.

با توجه به این که کلون کردن و شناسایی ژن GRA14 در وکتور pTG19-T، گام نخست در جهت کلونینگ این ژن در وکتور بیانی و دستیابی به آنتی ژن نو ترکیب GRA14 می‌باشد، بنابراین استفاده از آن در فرایند تولید کیت‌های تشخیصی و DNA واکسن جهت شناسایی و پیشگیری از ابتلا به عفونت توکسوپلاسموز به ویژه در زنان باردار و افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی از جمله مبتلایان به HIV/AIDS (Human immunodeficiency virus infection/acquired immunodeficiency syndrome) می‌تواند مفید واقع شود.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه آقای احسان احمدپور دانشجوی دوره دکتری تخصصی رشته انگل‌شناسی پزشکی می‌باشد که هزینه آن توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران طی طرح مصوب شماره ۳۲۷/۹۱ تأمین شده است. لذا از تمامی اعضای محترم گروه انگل‌شناسی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه کمال تشکر و قدردانی را دارد.

References

- Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol* 2009; 39(8): 895-901.
- Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis* 2012; 44(11): 805-14.
- Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan. Perspectives and Methods*. Waltham, MA: Academic Press; 2011.
- Zhang M, Joyce BR, Sullivan WJ, Nussenzweig V. Translational control in Plasmodium and toxoplasma parasites. *Eukaryot Cell* 2013; 12(2): 161-7.
- Kaye A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Health Care* 2011; 25(6): 355-64.
- Kur J, Holec-Gasior L, Hisczynska-Sawicka E. Current status of toxoplasmosis vaccine

development. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8(6): 791-808.

7. Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* 2008; 47(4): 554-66.

8. Daryani A, Hosseini AZ, Dalimi A. Immune responses against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. *Vet Parasitol* 2003; 113(2): 123-34.

9. Cesbron-Delauw MF. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today* 1994; 10(8): 293-6.

10. Mercier C, Adjogble KD, Daubener W, Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol* 2005; 35(8): 829-49.

وزینی و همکاران نیز جهت کلونینگ ژن GRAV توکسوپلاسمای گوندیی از پلاسمید pcDNA3 و سویه Top10 باکتری اشرشیاکلی استفاده نمودند. در این بررسی، بیان pcGRAV در سلول‌های CHO (Chinese hamster ovary) با استفاده از روش وسترن بلات و SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) تأیید شد (۱۷).

Bivas-Benita و همکاران، یک DNA واکسن حاوی ژن GRA1 را تهیه و پتانسیل ایجاد پاسخ ایمنی بعد از تجویز گوارشی را ارزیابی و مشاهده کردند که استفاده از واکسن پروتئینی GRA1 و سپس استفاده از پلاسمید GRA1 به عنوان یجادآور پاسخ ایمنی توأممان IgG2a/IgG1 (Immunoglobulin2a/immunoglobulin1) را علیه انگل تحریک می‌نماید (۱۸). در مطالعه Ram و همکاران نیز ژن GRA4 توکسوپلاسمای در پلاسمید pQE-30UA و باکتری اشرشیاکلی سویه M15 کلون گردید و ژن کلون شده در مقایسه با توالی ثبت شده در ژن بانک، همولوژی ۹۹/۲ درصد را نشان داد. از این ژن جهت ایمنی‌زایی در موش‌های آلوده شده به سویه RH توکسوپلاسمای استفاده شد، که زمان بقای موش‌های آلوده به انگل، به مدت دو روز افزایش یافت (۱۹).

نکته حایز اهمیت در مطالعات مختلف، استفاده از پلاسمیدها و سوش‌های مختلف باکتریایی جهت کلونینگ می‌باشد که

11. Rome ME, Beck JR, Turetzky JM, Webster P, Bradley PJ. Intervacuolar transport and unique topology of GRA14, a novel dense granule protein in *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 2008; 76(11): 4865-75.
12. Liu G, Cui X, Hao P, Yang D, Liu J, Liu Q. GRA 14, a novel dense granule protein from *Neospora caninum*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2013; 45(7): 607-9.
13. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Long Island, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
14. Kavakeb P, Kazemi B, Dorostkar Moghaddam D. Cloning, Expression and Characterization of *Toxoplasma gondii* P35 protein in *E. coli*. *Yakhteh Medical Journal* 2006; 8(3): 190-5.
15. Babaie J, Zare M, Sadeghiani G, Lorgard-Dezfuli M, Aghighi Z, Golkar M. Bacterial production of dense granule antigen GRA8 of *Toxoplasma gondii*. *Iran Biomed J* 2009; 13(3): 145-51.
16. Babaie J, Sadeghiani G, Golkar M. Construction and In vitro Expression Analyses of a DNA Plasmid Encoding Dense Granule GRA5 Antigen of *Toxoplasma gondii*. *Avicenna J Med Biotechnol* 2011; 3(3): 135-41.
17. Vazini H, Ghaffarifard F, Sharifi Z, Dalimi-Asl A. Characterization and expression of GRA7 gene of *Toxoplasma gondii* RH strain in eukaryotic pcDNA3 plasmid. *Feyz* 2013; 17(1): 8-13. (Persian).
18. Bivas-Benita M, Laloup M, Verstehey S, Dewit J, De BJ, Jongert E, et al. Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies. *Int J Pharm* 2003; 266(1-2): 17-27.
19. Ram H, Rao JR, Tewari AK, Banerjee PS, Sharma AK. Molecular cloning, sequencing, and biological characterization of GRA4 gene of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 2013; 112(7): 2487-94.