ORIGINAL ARTICLE

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

Ehsan Ahmadpour[1],
Shahabeddin Sarvi[2],
Ahmad Daryani[3],
Mehdi Sharif[3],
Mohammad-Bagher Hashemi Soteh[4],
Azadeh Mizani[1],
Kian Rezaee[5]

[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

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(112): 42-9 (Persian).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۱۲ اردیبهشت سال ۱۳۹۳ (۴۹-۴۲)

کلونینگ و توالی‌یابی پلاسمید کد کننده پروتئین گرانولی متراکم ۱۴ سویه RH توکسوپلاسما 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 توکسوپلاسما هستند. این بیماری بیشتر به دلیل عوارض وخیم آن، در موارد مادرزادی و نیز بیماران نقص سیستم ایمنی اهمیت دارد. ژن کد کننده پروتئین GRA۱۴ 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 GRA۱۴ سویه RH توکسوپلاسما گوندیی بود.

مواد و روش‌ها: در مرحله اول پس از جداسازی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسما 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 GRA۱۴ 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 GRA۱۴ نشان داد که این ژن ۱۲۲۷ جفت بازی با ژن GRA۱۴ 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 GRA۱۴ در پلاسمید pTG19-T مورد تأیید قرار گرفت.

استنتاج: ژن GRA۱۴ به طور موفقیت‌آمیزی 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: توکسوپلاسما گوندیی، GRA۱۴، کلونینگ

مقدمه

توکسوپلاسما گوندیی یک تک یاخته داخل سلولی اجباری است که طیف وسیعی از مهره‌داران را آلوده می‌کند و سازگاری 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

مولف مسئول: شهاب‌الدین سروی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی E-mail: shahabesarvi@yahoo.com

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

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

در حال حاضر، بررسی‌ها به سمت شناخت آنتی ژن‌های ایمنوژن و محافظت کننده توکسوپلاسما گوندیی سوق یافته است؛ زیرا با تشخیص این آنتی ژن‌ها می‌توان با تولید پپتیدهای مصنوعی و تولید منوکلونال آنتی‌بادی محافظت ایجاد کرد. آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی تاکی‌زوئیت توکسوپلاسما، به شدت ایمنوژن هستند و بررسی‌های 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 ایمنی‌زایی این آنتی ژن‌ها تأثیرگذار می‌باشند (۸، ۶).

آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی شامل سه دسته پروتئین‌های ترشحی میکرونم‌ها (MIC یا Microneme proteins)، راپتری‌ها (ROP یا Roptery proteins) و پروتئین‌های گرانولی متراکم (GRA یا Dense granule antigen) هستند، که هر سه نوع آنتی‌ژن دفعی- ترشحی پیش‌گفته، در تحریک پاسخ‌های ایمنی نقش دارند (۱۰، ۹، ۱).

پروتئین‌های گرانولی متراکم در حین یا بعد از تهاجم انگل توکسوپلاسما گوندیی به سلول میزبان، به داخل حفره پارازیتوفوروس اگزوسیتوز می‌شوند (۱۰). این پروتئین‌ها، محیط حفره پارازیتوفوروس را به نفع انگل تغییر می‌دهند و پایدار می‌کنند و باعث زنده ماندن و تکثیر تاکی‌زوئیت‌های انگل طی دوره درون سلولی می‌شوند (۱۰، ۹). تاکنون چندین پروتئین گرانولی متراکم شناخته شده و بررسی‌های متعددی روی برخی از آن‌ها صورت گرفته است و در این میان، GRA۷ (۲۹kD)، GRA۴ (۲۳kD) و GRA۱ (۴۰kD) ایمنی‌زایی نسبی خوبی نشان داده‌اند (۱۰، ۳).

یکی از جدیدترین پروتئین‌های گرانولی شناخته شده توکسوپلاسما گوندیی، GRA۱۴ می‌باشد که مطالعات اندکی روی آن انجام شده و نقش ساختاری و توپولوژی خاص این پروتئین تا حدودی مشخص شده است (۱۱). البته در سال‌های اخیر در تک یاخته نئوسپورا کانینوم نیز که هم خانواده توکسوپلاسما گوندیی است و در نشخوار کنندگان باعث سقط جنین می‌گردد، پروتئین‌های گرانولی متراکمی به نام GRA۱۴ شناسایی شده است (۱۲). این پروتئین که شامل ۴۰۹ اسید آمینه است، دارای توپولوژی خاصی می‌باشد؛ به طوری که انتهای کربوکسیل آن در سیتوپلاسم سلول میزبان و انتهای آمین آن در حفره پارازیتوفوروس قرار می‌گیرد. با توجه به الگوی خاص این پروتئین و وفور آن در سیستم PVM (Parasitophorus vacuole membrane) و IVM (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 می‌افتد. در شرایط حاضر، تولید و توسعه داروهای جدید ضد توکسوپلاسما یا یک واکسن، جایگزین بسیار مناسبی برای پیشگیری از عفونت خواهد بود (۷-۵).

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 مطالعه‌ای 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 توکسوپلاسما گوندیی برای اولین بار در ایران بود. نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند در تهیه DNA (Deoxyribonucleic acid) واکسن و نیز طراحی کیت تشخیصی توکسوپلاسموز مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تکثیر انگل و استخراج DNA

در این مطالعه از تاکی‌زوئیت‌های سوش استاندارد RH توکسوپلاسما گوندیی نگهداری شده در دانشکده پزشکی ساری استفاده گردید. به منظور تکثیر انگل، ابتدا به هر موش سوری

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

جدول شماره ۱: آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده برای تکثیر ژن GRA۱٤ توکسوپلاسما گوندیی به همراه توالی‌های برش آنزیمی (زیر محل اثر آنزیم خط کشیده شده است)

AAAAAG↓CTTATGCAGGCGATAGCG (Hind III)	آغازگر رفت (Forward)
AAAGAA↓TTCCTATTCGCTTGGTCTCTGGTA (EcoR I)	آغازگر برگشت (Reverse)

سفید تعداد ۸×۱۰^{۶}–۵ تاکی‌زوئیت به صورت داخل صفاقی تزریق شد و پس از ۴-۳ روز، مایع صفاق موش آسپیره شد و برای رسوب دادن انگل‌ها، لوله آزمایش حاوی تاکی‌زوئیت‌ها در g ۸۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید (۸، ۳). استخراج DNA تاکی‌زوئیت‌ها بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA (Bioneer, *AccuPrep*® Genomic DNA -۳۰۳۲ extraction kit, Cat. No.: K) انجام شد. غلظت و کیفیت DNAی به دست آمده با دو روش جذب نوری و الکتروفورز بررسی شد.

طراحی پرایمرها

جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR (Polymerase chain reaction) ابتدا آغازگرهای (Primer) رفت (Forward) و برگشت (Revers) با استفاده از اطلاعات تنها توالی ثبت شده در سایت http://www.ncbi.nlm.nih.gov به شماره FJ۰۱۵۰۶۱/۱ و 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 GRA ۱۴ توکسوپلاسما گوندیی با روش PCR

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از PCR master mixهای شرکت Bioneer کره (Cat No:K-۲۰۱۲) استفاده شد و تکثیر ژن GRA۱۴ در ۳۵ سیکل طبق برنامه به شرح زیر انجام شد: مرحله واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله واسرشتگی (Denaturation) به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال آغازگرها (Annealing) به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد، مرحله گسترش (Extension) به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و مرحله گسترش نهایی (Final extention) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

در نهایت، جهت تأیید انجام واکنش، محصول PCR بر روی ژل ۱ درصد آگارز در کنار نشانگر bp ۱۰۰ الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز و مشاهده قطعه ژنی GRA۱۴، طبق پروتکل کیت استخراج از ژل شرکت بیونر کره (Bioneer, AccuPrep® Gel Purification Kit, -۳۰۳۵-۱ Cat. No.: K) قطعه تکثیر یافته از بقیه مواد به کار رفته در PCR جدا گردید. جهت تأیید فرایند استخراج از ژل، ۳ میکرولیتر از محصول این مرحله بار دیگر روی ژل ۱ درصد الکتروفورز شد.

کلونینگ ژن GRA ۱۴ در پلاسمید pTG ۱۹-T و انتقال آن به باکتری مستعد Ecoli سوش Top ۱۰

در این مطالعه به منظور انجام کلونینگ از کیت T PCR-pTG۱۹cloning vector شرکت Vivantis استفاده شد. جهت انجام این کار در یک میکروتیوپ ۰/۵ میلی‌لیتری، واکنشی به حجم ۳۰ میکرولیتر به شرح جدول شماره ۲ تهیه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و سپس به صورت شبانه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

پس از انجام واکنش فوق جهت پذیرش (Transformation) پلاسمید حاوی ژن GRA۱۴، از باکتری Ecoli (Escherichia coli) سوش Top۱۰ مستعد شده به روش کلرید کلسیم استفاده شد (۱۳). پس از مستعد کردن

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

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

مقدار	ماده
۵ µl	PCR product
۳ µl	Vector
۶ µl	5x Ligation buffer
۱ µl	T۴ DNA Ligase
۱۵ µl	Nuclease-free water
۳۰ µl	Total

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 آمپی سیلین، X-gal (۵-bromo-۴-chloro-۳-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside) و IPTG (Isopropy۱ β-D-۱-thiogalactopyranoside) 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 استفاده از PCR Master Mix های شرکت Bioneer واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 (AccuPrep® Plasmid Mini Extraction -۳۰۳۰-۱ Kit, Cat. No.: K) شرکت Bioneer، 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 X۱۰ 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 GRA۱۴ کلون شده:

برای تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن GRA۱۴ کلون شده، محصول حاصل از برش آنزیمی با استفاده از کیت استخراج از ژل (Bioneer, AccuPrep® Gel Purification-۳۰۳۵-۱ Kit, Cat. No.: K) استخراج و تخلیص شد و جهت تعیین توالی به شرکت فزابیوتک ارسال شد. نتیجه تعیین توالی ژن کلون شده با استفاده از سایت اینترنتی www.ncbi/blast از نظر تشابهات و اختلافات با ژن GRA۱۴ توکسوپلاسما گوندیی موجود در بانک جهانی ژن مقایسه گردید.

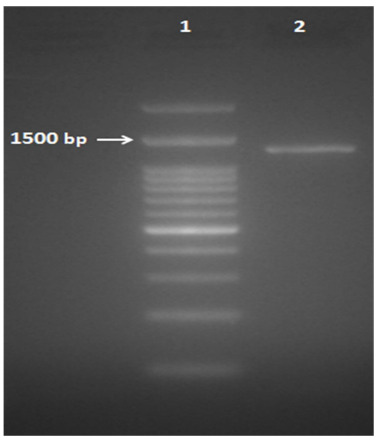
یافته‌ها

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

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 توکسوپلاسما، محصول واکنش بر روی ژل ۱ درصد آگارز الکتروفورز شد و باندی در محدوده ۱۲۲۷ bp مشاهده گردید که نشان دهنده تکثیر اختصاصی ژن کد کننده پروتئین GRA۱۴ می‌باشد (تصویر شماره ۱).



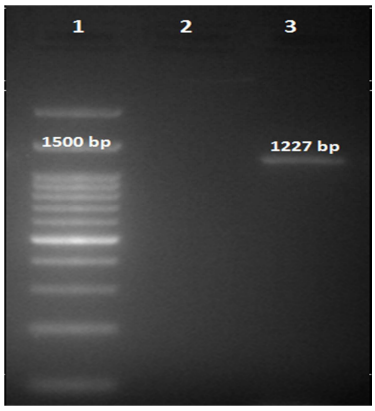
تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن GRA١٤ توکسوپلاسما گوندیی بر روی ژل آگارز ۱ درصد (ستون ۱: نشانگر با وزن ملکولی bp ۱۰۰، ستون ۲: قطعه ۱۲۲۷ جفت بازی ژن GRA١٤)

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 نوترکیب در پلاسمید pTG۱۹-T از کلونی‌های سفید طبق پروتکل دمایی و زمانی پیش‌گفته برای PCR اولیه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد و با الکتروفورز محصول واکنش وجود ژن GRA۱۴ تأیید گردید (تصویر شماره ۲).

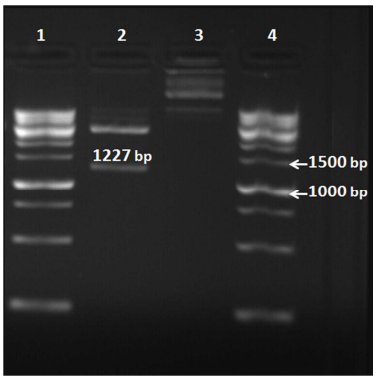
در ادامه پس از تأیید کلون نوترکیب با PCR، جهت تأیید با روش هضم آنزیمی، کلونی‌های حاوی ژن کشت داده شد و پلاسمید استخراج گردید و در نهایت، در معرض آنزیم‌های محدودالاثر EcoRI و HindIII قرار گرفت که در الگوی الکتروفورزی آن دو باند که یکی مربوط به پلاسمید و دیگری باندی ۱۲۲۷ نوکلئوتیدی که نشان دهنده وجود ژن 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 توکسوپلاسما گوندیی 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: نشانگر با وزن ملکولی bp ۱۰۰، ستون ۲: محصول PCR از کلونی آبی فاقد ژن GRA١٤، ستون ۳: محصول PCR از کلونی سفید حاوی قطعه ژنی ۱۲۲۷ جفت بازی ژن GRA١٤)

PCR :Polymerase chain reaction

GRA۱۴ :Dense Granule Antigen 14



تصویر شماره ۳: الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید pTG۱۹-T حاوی ژن GRA١٤ توکسوپلاسما گوندیی بر روی ژل آگارز ۱ درصد (ستون‌های ۱ و ٤: نشانگر با وزن ملکولی kb ۱، ستون ۲: محصول برش آنزیمی شامل قطعه ۱۲۲۷ جفت بازی ژن GRA١٤ در پایین و پلاسمید در بالا، ستون ۳: پلاسمید حاوی ژن مورد نظر بدون برش آنزیمی)

GRA۱۴ :Dense Granule Antigen 14

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

ATGCAGGCGATAGCGCGGGGGGACCGCTCGTCGGGGTGGTCGAGTTGTAGCTGGCTTTTCTATTTTTCGTTTCTGCTT
CTAACGAGTGAAGCAGTGGCTGCAGCTGCCAGTTTGGAGCAGACAATTCCCTATTCTGTCCAACATCAACCGCAGCAG
GAAGGCATCCTCGGCACACAGAAACCCCAGACTGCCCCAACTCCTCAGCAGCTCATTGTGCCCGTAAGCTATCTAGGA
GATGGTTTGTCATACTTCTCTGGAGTTCTTAGGCGTTTACCCCTCGATGTTGCATTGGAACGTTTAACTAGTGCTCGG
GAAATACCAACTGTGGCAGGTTTTGTTCAAAAATATGTGCTGGCGGCCCAGCTATCTCGATCCCTTCAGAGCACGGCG
AACGGCGTGAAGAAGATTCTAATGCGTCTCGATGCAGCCAAAAATGAAGAAGGATTTATAACAGATCTGTTGAAGTCC
GCTCCTGAGGTTCAAGAAGTTCTGAGCCGTTTCCTTGGTTCTGTTGCGTCTGCACTTGCTCTTTTGGACATCAATGGT
CTCCATGAGGCGGTTGACGCTAGTCTCCCCGTGACAAAAGCAGTGGTCATGCTGTACTTACATCTAGTGAGTGTCGTA
CCGCCGAAACAACGGGATCCTTTCTCTCCTTTCCTTCTTTATCTGCAAGATGCCGTGGGAGAGTTCAAGATCATGGAG
GACCATGTCGCCTCTGTTGTTGCTGGTGAGGCACAGGAGGAAAATGTTATAAACAGTCAACCACAGGGAACGGAAACG
TCGCACAGGGCGGTAGTGAGAGGGGGCATAAGAATGCTACAATCTGGGACCTCCGAAACCACGAAGCTGCGGAGGACG
TGGTGGAGGTTATTTAAAGTGGCTGCTCTCGCCGTCTTAACGATGGCACTGCTGAAATATGGTACGCCTCGTGTGCGC
GCTTTTCTCGAGAGAAGGCGGATGCGCCGAGACGGAGGTGGGGACAGTGGAGACTTTGGAGAAGAGGGGCGCTCAAAA
GGAGACGTGTCAACTTCTGATGATATGCCCAGAGAGCCGCCGCCGCCGTACTCTCCGCCCATGTATCCGTTCGCCGAT
CCTGAACACAGATGGGCTGGTACGTACGGAACGTCTCATGGAGGTTATCGAGTACAACCGACAGCTCCACCCGCCCCT
GCGTCTATGCTATATCCGAGTTTACACAGGCTGGGCTACCAGAGACCAAGCGAATAG

تصویر شماره ٤: توالی DNA ژن کد کننده پروتئین GRA١٤ در سویه RH توکسوپلاسما

GRA۱۴ :Dense Granule Antigen 14

بحث

آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی انگل نقش مهمی در تحریک سیستم ایمنی میزبان دارند؛ به طوری که این نوع از آنتی ژن‌ها در عفونت‌های انسانی بسیار ایمونوژن هستند و محرک قوی‌تری نسبت به آنتی‌ژن‌های محلول و کیستی، برای سیستم ایمنی سلولی می‌باشند. همچنین در مقایسه با آنتی‌ژن تام توکسوپلاسما، سبب تحریک و تکثیر بیشتر لنفوسیت‌های T می‌شوند. از این رو، آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی به عنوان کاندیدای مناسب برای بررسی‌های ایمونیزاسیون پیشنهاد شده‌اند (۸، ۶، ۳). گرانول‌های ترشحی متراکم توکسوپلاسما گوندیی، 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 آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی توکسوپلاسما می‌باشند (۱۲، ۱۰، ۹).

در مطالعه حاضر ژن گرانول ترشحی متراکم ۱۴ توکسوپلاسما گوندیی، برای اولین بار در سلول پروکاروتیک کلون گردید و مشاهده شد که فاقد ناحیه اینترون می‌باشد. آنالیز ژن مورد نظر و مقایسه آن با ژن ثبت شده برای GRA۱۴ توکسوپلاسما در بانک ژنی وجود هموژنیسیتی را در نوکلئوتیدها نشان داد. این مطالعه نیز همانند اکثر مطالعات دیگر که بر روی ژن‌های مختلف توکسوپلاسما انجام شده است، اولین قدم و پایه مطالعات بعدی جهت انجام بیان این ژن و تهیه پروتئین نوترکیب می‌باشد. در زمینه تهیه واکسن DNA علیه انگل توکسوپلاسما گوندیی و نیز استفاده از آنتی‌ژن‌های نوترکیب 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 توکسوپلاسما گوندیی 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 توکسوپلاسما گوندیی 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 توکسوپلاسما گوندیی را در پلاسمید pcDNA۳/۱ کلون نمودند. برای بررسی بیان این ژن از سلول‌های HEK ۲۹۳-T بافت کلیه انسان استفاده شد و با روش وسترن بلات و رنگ‌آمیزی فلورسنت مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶). همچنین

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

وزینی و همکاران نیز جهت کلونینگ ژن GRA۷ توکسوپلاسما گوندیی از پلاسمید pcDNA۳ و سویه Top۱۰ باکتری اشرشیاکلی استفاده نمودند. در این بررسی، بیان pcGRA۷ 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 GRA۱ را تهیه و پتانسیل ایجاد پاسخ ایمنی بعد از تجویز گوارشی را ارزیابی و مشاهده کردند که استفاده از واکسن پروتئینی GRA۱ و سپس استفاده از پلاسمید GRA۱ به عنوان یادآور پاسخ ایمنی توأمان IgG۲a/IgG۱ (Immunoglobulin۲a/immunoglobulin۱) را علیه انگل تحریک می‌نماید (۱۸). در مطالعه Ram و همکاران نیز ژن GRA۴ توکسوپلاسما در پلاسمید pQE-۳۰UA و باکتری اشرشیاکلی سویه M۱۵ 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 توکسوپلاسما 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 برخی از این نظر با مطالعه حاضر دارای تفاوت‌هایی می‌باشند. در این مطالعه از پلاسمید pTG۱۹-T و باکتری Ecoli سویه Top۱۰ استفاده شد و نشان داد که جهت انجام کلون ژن GRA۱۴، پلاسمید و باکتری پیش‌گفته مناسب می‌باشد.

با توجه به این که کلون کردن و شناسایی ژن GRA۱۴ در وکتور pTG۱۹-T، گام نخست در جهت کلونینگ این ژن در وکتور بیانی و دستیابی به آنتی ژن نوترکیب GRA۱۴ 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

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]

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, Ghaffarifar 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, Versteyhe 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-04-20]