

Cloning and Expression of *Toxoplasma gondii* Rhoptry13 Gene in pcDNA3 Plasmid

Paria Alizadeh¹,
Ahmad Daryani²,
Ehsan Ahmadpour³,
Tohid Kazemi⁴,
Adel Spotin³,
Mahmoud Mahami-Oskoui⁵,
Yaghob Azadi¹,
Saba Rajabi¹,
Dariush Shanehbandi⁶

¹ Msc Student in Parasitology, Students Research Committee, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

² Professor, Department of Parasitology, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Associate Professor, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁶ Assistant Professor, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received July 7, 2018; Accepted January 8, 2019)

Abstract

Background and purpose: *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) is an obligatory intracellular protozoan parasite. Toxoplasmosis is highly prevalent and has a great effect on public health, therefore, there is a need for vaccine and sensitive diagnostic procedures. This study aimed at cloning and investigating the expression of ROP13 gene of *T. gondii*.

Materials and methods: In this study, the gene was cloned in pTG19-T vector and transferred to a TOP10 strain of *E.coli* following ROP13 gene amplification using PCR. Then the ROP13 gene was sub cloned in expression plasmid pcDNA3. Also, pcROP13 was transferred to CHO cells and the expression level was evaluated by IFA method.

Results: Cloning and sub cloning of ROP 13 gene were confirmed by PCR, sequencing and enzymatic digestion. The gene sequencing showed complete homology with a recorded sequence in the gene bank. Moreover, the expression of ROP13 gene in CHO eukaryotic cells was confirmed by IFA method.

Conclusion: The results showed that ROP13 gene was successfully sub cloned into the pcDNA3 expression vector and expressed in CHO cells. Therefore, it can be used in the development of vaccines and in diagnostic tests.

Keywords: toxoplasmosis, Rhoptry 13, pcDNA3, gene expression

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28 (169): 26-35 (Persian).

* Corresponding Author: Ehsan Ahmadpour- Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
(E-mail: Ehsanahmadpour@gmail.com)

کلونینگ و بیان ژن کد کننده راپتری سیزده (ROP13) سویه RH توکسوپلازما گوندیی

پریا علیزاده^۱
احمد دریانی^۲
احسان احمدپور^۳
توحید کاظمی^۴
عادل اسپوتین^۳
محمود محامی اسکویی^۵
یعقوب آزادی^۱
صبا رجبی^۱
داریوش شانه بندی^۶

چکیده

سابقه و هدف: توکسوپلازما گوندیی انگل تک یاخته درون سلولی اجباری می باشد. با توجه به شیوع بالای توکسوپلاسموزیس و اهمیت وافر این بیماری در بهداشت عمومی، دستیابی به واکسن موثر و روش های تشخیصی حساس برای این بیماری، بیش از پیش حائز اهمیت است. هدف از این بررسی، شناسایی و کلون کردن ژن کد کننده پروتئین ROP13 سویه RH انگل توکسوپلازما گوندیی و بیان آن در سلول یوکاریوتیک CHO بود.

مواد و روش ها: در این تحقیق، ژن ROP13 پس از تکثیر با روش PCR، در پلاسمید انتقالی pTG19-T کلون و پس از آن در سوش TOP10 باکتری *E.coli* ترانسفورم شد. سپس ساب کلونینگ ژن ROP13 در پلاسمید بیانی pcDNA3 انجام شد. هم چنین پلاسمید pcROP13 در سلول یوکاریوتی CHO ترانسفکت شد و به منظور بررسی بیان ژن نو ترکیب از روش IFA استفاده شد.

یافته ها: با استفاده از روش های PCR، تعیین توالی و روش هضم آنزیمی، کلونینگ ژن ROP13 در پلاسمیدهای بیانی و انتقالی تأیید شد. نتایج تعیین توالی ژن کد کننده ROP13 با سویه RH ثبت شده در بانک جهانی ژن تشابه کامل داشت. هم چنین با استفاده از روش IFA، بیان ژن ROP13 در سلول یوکاریوتیک CHO مورد تأیید قرار گرفت.

استنتاج: نتایج نشان داد که کلونینگ و ترانسفورم قطعه ROP13 در پلاسمید pcDNA3 با موفقیت انجام شده و در سلول یوکاریوت CHO بیان می شود. لذا از این پلاسمید نو ترکیب می توان در مطالعات آتی به منظور واکسیناسیون و تشخیص عفونت می توان بهره برد.

واژه های کلیدی: توکسوپلاسموزیس، ROP13، pcDNA3، بیان سلولی

مقدمه

توکسوپلازما گوندیی تک یاخته ای با انتشار جهانی است که بسیاری از موجودات خونگرم از جمله حیوانات خانگی، دام ها، پرندگان و انسان را آلوده می کند (۱، ۲). توکسوپلاسموزیس در افراد سالم و دارای سیستم ایمنی

E-mail: Ehsanahmadpour@gmail.com

مؤلف مسئول: احسان احمدپور - تبریز: آبرسان، گلگشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۲. استاد، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴. دانشیار، گروه ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

۵. دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

۶. استادیار، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۴/۲۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۱۸

مواد و روش ها

کشت انگل و استخراج DNA

سویه حاد انگل توکسوپلازما گوندی (RH) از مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه گردید و به منظور پاساژ متوالی، انگل به داخل صفاق به موش های نژاد BALB/C تزریق گردید. برای استخراج DNA از تعداد 5×10^6 تاکی زوئیت در حجم ۱۰۰ میکرولیتر استفاده شد (۱۰). استخراج DNA از تاکی زوئیت ها با کیت استخراج DNA شرکت بیونیر کره جنوبی (Bioneer, AccuPrep® Genomic DNA-3032) و طبق دستورالعمل کیت انجام شد. غلظت و کیفیت DNA به دست آمده با استفاده از دستگاه نانودراپ سنجیده شد.

پرایمرها

جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز یا PCR (Polymerase chain reaction) ابتدا آغازگرهای رفت و برگشت با استفاده از اطلاعات تنها توالی ثبت شده و موجود در سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> بلاست گردید و صحت آن مورد تایید قرار گرفت (جدول شماره ۱) (Accession no: JN051278.1). جهت انجام برش آنزیمی، توالی های حاوی جایگاه های برش آنزیمی BamH I و Xba I به عنوان Linker به ابتدای آغازگر رفت و برگشت اضافه شد.

جدول شماره ۱: آغازگرهای رفت و برگشت طراحی شده برای تکثیر ژن ROP13 توکسوپلازما گوندی به همراه توالی های برش آنزیمی (زیر محل اثر آنزیم خط کشیده شده است)

آغازگر رفت (Forward)	GCGGATCCATGAAGAGACAGAGCTTGTG (BamH I)
آغازگر برگشت (Reverse)	GCCTAGATCACAATAGCCTCAAGGAATTC (Xba I)

تکثیر و جداسازی ژن ROP13 توکسوپلازما گوندی

با روش PCR

برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز از مسترمیکس PCR شرکت سیناکلون (Cat No: PL5202) و DNA

نرمال عمدتاً فاقد علائم کلینیکی می باشد ولی در افراد با اختلال ایمنی (Immunocopromised) به خصوص در مبتلایان به نقص سیستم ایمنی، به عنوان یک عفونت فرصت طلب بوده و بیماری وخیم و کشنده ایجاد می کند (۴،۳). در خانم های باردار نیز می تواند منجر به بروز عوارض شدید چشمی یا عصبی و حتی سقط جنین شود (۵). اثرات سمی ناشی از داروهای ضد توکسوپلاسمایی موجود، ضرورت پیدایش داروهای جدید جایگزین و یا یک واکسن موثر را ضروری می نماید (۶). در سال های اخیر پیشرفت هایی در زمینه شناسایی کاندیدهای واکسن که القاکننده پاسخ های حفاظتی مناسب در بدن بوده اند، صورت گرفته است و مطالعات انجام شده نشان داده است که احتمال دست یابی به واکسن مناسبی بر علیه توکسوپلاسموزیس وجود دارد (۷-۹). از بین آنتی ژن های متعدد توکسوپلازما گوندی، بیش ترین مطالعات بر روی آنتی ژن های دفعی - ترشحی و آنتی ژن های سطحی تاکی زوئیت انجام شده است (۱۰). آنتی ژن های دفعی - ترشحی در پاتوژن، مصونیت و فرار انگل از سیستم ایمنی و هم چنین در تحریک پاسخ های ایمنی نقش دارند (۱۱). با توجه به نقش کلیدی و بیولوژیکی راپتری ها در تهاجم و بقاء انگل، این آنتی ژن ها به عنوان کاندید واکسن مورد مطالعه قرار گرفته اند (۱۲). پروتئین راپتری ۱۳ یکی از جدیدترین پروتئین های شناخته شده ی توکسوپلازما گوندی می باشد که مطالعات اندکی روی آن صورت گرفته است. تاکنون مطالعه ای در خصوص کلونینگ و توالی یابی پلاسمید کدکننده ی ژن ROP13 توکسوپلازما گوندی در ایران صورت نگرفته است، بنابراین هدف از این پژوهش، شناسایی و کلون کردن ژن کدکننده ی این پروتئین در سویه RH توکسوپلازما گوندی و بیان آن در سلول یوکاریوتیک CHO می باشد. نتیجه این مطالعه می تواند در تهیه یک واکسن موثر و در نتیجه کاستن از عوارض بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

ژنومی حاصل از تاکی زوئیت‌ها به عنوان الگو برای تکثیر ژن مورد نظر با روش PCR مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر ژن ROP13 در ۳۵ سیکل بدین شرح انجام شد: ۵ دقیقه مرحله واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱ دقیقه واسرشتگی (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد (Annealing) و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (Extention) و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به عنوان گسترش نهایی (Final extention) قرار گرفت. سپس، جهت تایید انجام واکنش صورت گرفته، محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز و مشاهده قطعه ژنی ROP13، طبق پروتکل کیت استخراج از ژل شرکت بیونر کره (K Bioneer, AccuPrep® Gel Purification Kit, 30351) قطعه مورد نظر از ژل استخراج گردید.

کلونینگ ژن ROP13 در پلاسمید pTG19-T vector
انتقال آن به باکتری مستعد *E. coli* سوش Top10
به منظور انجام کلونینگ از کیت کلونینگ pTG19-t cloning vector ساخت شرکت Vivantis طبق دستورالعمل کیت استفاده گردید (جدول شماره ۲). سپس جهت پذیرش پلاسمید حاوی ژن ROP13، از باکتری *E. coli* سوش Top10 مستعد شده به روش کلرید کلسیم استفاده شد (۱۳). پس از مستعد کردن باکتری‌ها برای پذیرش پلاسمید، ۱۰ میکرولیتر از پلاسمیدهای حاوی ژن مورد نظر به میکروتیوپ حاوی باکتری مستعد شده اضافه 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

مقدار	ماده
5µl	PCR product
2µl	Vector
6µl	5x Ligation buffer
1µl	T4 DNA Ligase
16µl	Nuclease- free water
30µl	Total

سپس این باکتری‌ها به مدت ۶۰ دقیقه داخل انکوباتور شیکردار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در محیط کشت LB مایع فاقد آنتی بیوتیک کشت داده شد و پس از آن محیط کشت در 5000 rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید. از رسوب باقی مانده در سطح پلیت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، X-gal و IPTG اضافه و پخش گردید و به مدت ۱۶-۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جهت تایید کلونینگ و انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری از روش های زیر استفاده گردید:

۱- تشکیل پرگنه های سفید و آبی

پس از کشت باکتری های ترانسفورم شده، در سطح محیط کشت پرگنه های آبی (پرگنه فاقد پلاسمید نوترکیب) و سفید (پرگنه حاوی پلاسمید نوترکیب) دیده می شود.

۲- انجام Colony PCR از پرگنه های سفید

برای این کار ۳-۲ عدد از پرگنه های سفید حاصل مرحله ترانسفورم انتخاب و با استفاده از PCR Master Mix شرکت Ampliqon (Cat. No.: A190303) واکنش زنجیره ای پلیمرز انجام شد و سپس محصول به دست آمده در ژل آگارز الکتروفورز گردید تا وجود قطعه کلون شده مورد نظر تایید 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 شرکت GeneAll کشور کره (Exprep Plasmid SV-mini 101-150) پلاسمید از باکتری استخراج شد. به منظور برش آنزیمی به صورت Double digestion از دو آنزیم BamH1 و Xba1 شرکت Jena Bioscience آلمان، در یک میکروتیوپ استریل طبق دستورالعمل آنزیم‌ها استفاده شد.

۴- تعیین توالی ژن ROP13 کلون شده

برای تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن ROP13 کلون شده، محصول حاصل از برش آنزیمی با استفاده از کیت استخراج از ژل (Cat. No.: K Bioneer, AccuPrep® Gel Purification Kit, -3035-1) استخراج و تخلیص گردیده و جهت تعیین توالی به شرکت پویا گستر ژن ارسال شد. نتیجه تعیین توالی ژن کلون شده با استفاده از سایت اینترنتی <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> از نظر تشابهات و اختلافات با ژن ROP13 توکسوپلازما گوندی موجود در بانک جهانی ژن مقایسه گردید.

برش آنزیمی پلاسمید pTROP13 و پلاسمید بیانی

به منظور برش آنزیمی به صورت Double Digestion از ۲ آنزیم *BamH1* و *Xba1*، هم چنین پلاسمید pcDNA3 برای پذیرش قطعه ROP13 و انجام کلونینگ با آنزیم های فوق برش داده شد و نتایج برش آنزیمی هر کدام روی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده گردید.

ساب کلون ژن ROP13 در پلاسمید pcDNA3

برای این منظور واکنش اتصال (Ligation reaction) براساس دستورالعمل کیت (vivantis) به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر پلاسمید pcDNA3 (برش خورده با آنزیم های *BamH1* و *Xba1*)، ۱۲ میکرولیتر قطعه ROP13 (جداشده از پلاسمید نو ترکیب pT-ROP13)، ۲ میکرولیتر آنزیم *T4DNA ligase*، ۲ میکرولیتر بافر آنزیم و ۱ میکرولیتر آب مقطر (Nuclease free) تهیه شد. پس از ورتکس و Spin، مخلوط فوق به مدت یک ساعت در ۲۲ درجه سانتی گراد و سپس به طور شبانه در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد.

انتقال پلاسمیدهای کلون شده داخل ناقل باکتریایی *E.coli*

سوش TOP10

۱۰۰ میکرولیتر از باکتری مستعدی که قبلاً تهیه و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شده بود، به مدت نیم ساعت روی یخ قرار داده شد و به دمای صفر

رسید. ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش اتصال را به ۱۰۰ میکرولیتر باکتری مستعد اضافه و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور شیکردار در محیط LB مایع بدون آنتی بیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. بعد از اتمام مدت انکوباسیون، در دور ۷۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد.

غریبال کردن پرگنه های باکتری حاوی پلاسمید

نو ترکیب pcROP13

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری های ترانسفورم شده به پلیت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین اضافه شد و در سطح محیط LB آگار پخش گردید و overnight در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. باکتری های حاوی پلاسمید توانایی رشد روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین را دارند.

روش های تایید کننده کلون شدن قطعه ROP13

پلاسمید بیانی pcROP13

به منظور تایید انجام ساب کلونینگ ROP13 در پلاسمید pcDNA3 همانند کلونینگ مرحله اول از روش های کلونی PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی استفاده شد.

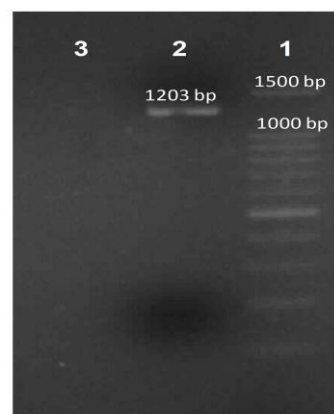
بیان پلاسمید نو ترکیب pcROP13 در شرایط *In vitro*

برای انجام ترانسفکشن از سلول یوکاریوتیک CHO کشت داده شده در محیط RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و آنتی بیوتیک پنیسیلین-استرپتومایسین استفاده گردید (۱۴). برای ترانسفکشن سلول یوکاریوتیک در این مطالعه از کیت ترانسفکشن PolyPlus ساخت کشور فرانسه (Cat No. 114-01) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. پس از ترانسفکشن، به سلول های یوکاریوتیک ترانسفکشن شده ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه کرده و به درون پلیت کشت سلول انتقال داده شد. پلیت حاوی سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ انکوبه شد. پس از ۴۸ ساعت بیان ژن در سلول های یوکاریوتیک با

روش IFA (Indirect Immuno fluorescence assay) مورد مطالعه قرار گرفت (۱۲). به طور خلاصه سلول‌ها، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن بر روی لام فیکس شدند. سپس سرم بیماران مبتلا به توکسوپلاسموزیس با تیترا بالای IgG به عنوان آنتی بادی اولیه و آنتی IgG ضد توکسوپلاسموزیس نشاندار شده با ماده فلورسانت (FITC) به عنوان آنتی بادی ثانویه مورد استفاده قرار گرفت. شستشوی لام‌ها در هر مرحله سه بار و توسط PBS انجام شد. در نهایت سطح لام با گلیسرین پوشانده و با میکروسکوپ فلورسانس بررسی شد.

یافته‌ها

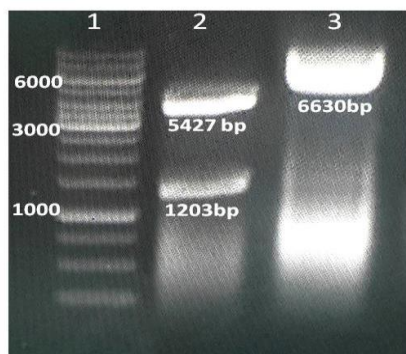
در مرحله اول، استخراج DNA از تاقی ژوئیت‌های سویه RH توکسوپلازما انجام شد و صحت انجام استخراج با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد تایید گردید. پس از آن واکنش زنجیره ای پلیمراز از DNA ژنومی با پرایمرهای طراحی شده برای ژن ROP13 توکسوپلازما گوندی انجام شد. محصول واکنش PCR بر روی ژل ۱ درصد آگارز الکتروفورز گردید و باندهی در حدود ۱۲۰۳ جفت باز مشاهده گردید که نشان دهنده تکثیر اختصاصی ژن کد کننده پروتئین ROP13 می‌باشد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصول PCR ژن ROP13 توکسوپلازما گوندی بر روی ژل آگارز ۱ درصد (ستون ۱: نشانگر با وزن مولکولی ۱۰۰bp، ستون ۲: قطعه ۱۲۰۳bp ژن ROP13 توکسوپلازما گوندی، ستون ۳: کنترل منفی)

کشت باکتری‌های ترانسفکت شده با پلاسمیدها بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، IPTG و X-gal، باعث تشکیل پرگنه‌های سفید و آبی شد که نشان دهنده انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری (پرگنه‌های سفید) مورد نظر بود. هم چنین وجود ژن نوترکیب در پلاسمید pTG19-T با روش کلونی PCR بر روی پرگنه‌های سفید طبق پروتکل دمایی و زمانی ذکر شده و روش هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب مورد تایید قرار گرفت (تصویر شماره ۲).

در ادامه جهت انجام ساب کلونینگ و بررسی بیان ژن ROP13 از وکتور بیانی pcDNA3 و باکتری TOP10 استفاده شد و پس از انتقال پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری و کشت باکتری‌ها، تشکیل پرگنه‌های باکتری بر روی محیط کشت LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، نشان دهنده ترانسفورماسیون موفق پلاسمید در باکتری مستعد بود. ساب کلونینگ ژن ROP13 در وکتور pcDNA3 نیز با روش کلونی PCR و روش هضم آنزیمی مورد تایید قرار گرفت (تصویر شماره ۲). تعیین توالی ژن مورد نظر در هر دو پلاسمید انتقالی و بیانی مقایسه آن با ژن ثبت شده در NCBI نشان داد که این توالی با ژن ROP13 توکسوپلازما گوندی ثبت شده در بانک جهانی ژن، ۱۰۰ درصد همخوانی دارد (تصویر شماره ۳).



تصویر شماره ۲: الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید pcDNA3 حاوی ژن ROP13 انگل توکسوپلازما گوندی بر روی ژل آگارز ۱ درصد (ستون ۱: نشانگر با وزن مولکولی 1Kb، ستون ۲: محصول هضم آنزیمی پلاسمید pcROP13 با آنزیم های BamH I و Xba I ستون ۳: پلاسمید pcROP13 بدون برش آنزیمی)

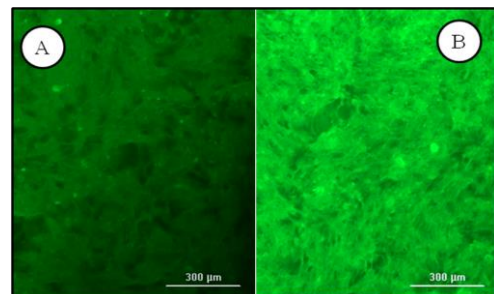
بحث

در این مطالعه ژن ROP13 توکسوپلازما گوندیی در پلاسمیدهای pTG19-T و pcDNA3 به ترتیب کلون و ساب کلون گردید و بیان ژن کامل ROP13 در شرایط *In vitro* در سلول‌های یوکاریوتیک CHO مورد تایید قرار گرفت. به دلیل اهمیت بیماری توکسوپلاسموزیس در افراد مبتلا نقص سیستم ایمنی و زنان باردار و همچنین زیان‌های فراوان اقتصادی و اجتماعی ناشی از آن، پیشگیری از بروز بیماری و هم‌چنین تشخیص و درمان به موقع ضروری می‌باشد (۵،۴). لذا دست‌یابی به یک واکسن موثر و مقرون به صرفه جهت کاهش موارد ابتلا و مرگ و میر ناشی از بیماری و به علاوه طراحی و ساخت کیت‌های تشخیصی برای شناسایی عفونت و حتی افتراق عفونت حاد و مزمن دارای اهمیت می‌باشد (۹،۱۴). آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی انگل توکسوپلازما گوندیی که باعث ایجاد ایمنی حفاظتی موثر علیه انگل می‌شوند، شامل مواد مترشحه از ارگانل‌های میکروم، راپتری و گرانول‌های متراکم می‌باشند (۱۱). این آنتی‌ژن‌ها به دلیل قدرت فراوان در تحریک سیستم ایمنی میزبان و ایمونوژن بودن نسبت به سایر آنتی‌ژن‌ها، بیش‌تر حائز اهمیت بوده‌اند و مطالعات فراوانی بر روی آن‌ها انجام شده است. از این رو آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی به عنوان کاندیدهای مناسب برای بررسی‌های ایمونیزاسیون و حتی تشخیص عفونت توکسوپلازما پیشنهاد شده‌اند (۱۷-۱۵). راپتری پروتئین‌ها به دلیل نقش مهم و اساسی که در دسترسی به سیتوپلاسم سلول میزبان دارند، به عنوان یکی از مهم‌ترین اجزا در بین ارگانل‌های دفعی - ترشحی یاد شده‌اند (۱۸). بدین منظور مطالعات متعددی بر روی آنتی‌ژن‌های مختلف توکسوپلازما گوندیی به صورت پلاسمید و یا پروتئین نو ترکیب انجام شده است. با وجود این تاکنون مطالعه‌ای در زمینه کلون و بیان ژن ROP13 انگل توکسوپلازما گوندیی در ایران صورت نگرفته است. این مطالعه نیز همانند مطالعات قبلی، اولین قدم برای مطالعات بعدی جهت تولید پروتئین‌های نو ترکیب

در نهایت بررسی بیان سلول‌های CHO ترانسفکت شده با پلاسمید pcROP13 با روش IFA انجام شد و نتایج نشان داد که سلول‌های حاوی این ژن، رنگ فلورسنت سبز را از خود ساطع کردند (تصویر شماره ۴).

>Toxoplasma gondii isolate RH rhoptry protein 13 (ROP13) gene, complete cds GenBank: JN051278.1
ATGAAGAGAACAGAGCTTTGTATCGCAGCCCTCGTG
GCTGTGGTGCGTTTGTCTTTACCTCACCAAAATG
CAGTGGCGAAGAGCTTCGAGCGGAACCTCGGCCACC
TGGACGCCCTCCTCGTTCTGTCTCTCCCTCAA
TTCGGATGTGGAGCTCGGTAGGAGCACTTCCCTGTCT
CAGTCACTGTCTTTCACGAAGGCACCAACGAG
ACAAACCCACCGACATCCCGGCCCCAGGTTGGAAA
TACGAAGGCAGCGACCTGCATCGAAGAGTGGTGG
CTCGACGGGAGGAACACAAAAAGCGTCAAGAAGAG
TGGGAACAGAGGAAGCCAGTCGACGCTCTGCACT
CACTCCGAGTGCACCCGATCCCGATGGTGACGGTGA
TCCAGCAACTTCACTTCCATCACAACGGAGACTC
CTTGACCGTTGTCTTCAACAATTCGTAACAACCTCG
TGGATTGGAGAATCTCTGCAAGGGCAGCCCGG
AACCTGATGACTGCAGGTGCGCGTCCAAGAAATCC
TGGCGAATCAGTCGTTTGGGGCTCTTACACAAC
TGTCAATAAGTTTCTCCATTTTGTCAATAGGGACCCCT
CGACGGTTGTCTATTTCCAGTCTCTCGTCAACA
GATTTCGCGCTCACGGTCAAGCTCAAACATCTCTCTGG
ATAGAAATCCGGGATGCGCAGCTCTCTCCCTGC
CAGTATACATTGGGTTGGTCTCTTCGATGTGTTCAA
GAGCGAAGAATTCACTAGAAAAGGTAATTCGATG
CTCGGAGGATTTCCGGCAGGAGCGCCAGAGAGGAGCC
AAGCAAAGCTGGGAGGGCGGCTGCGGCTGTCAATT
CGATTCAATGGGACTTACGCGGAGAGACAAACGTTT
TACCAACCTTTCTGTGTCTGTCACAAACCCAGGCAG
CAATGCTGCTGTCTGATGGTTTGAACATCCGTTTCT
CTCGATACTCGTAAACATGGCCTGTGTAGCGGG
CAGCCTTTGCCGCAAGGGAATTCGAGAGGTACTCTTG
CGAGCTCTTCGGGAGGCAGACTTCCAGACGGAG
GGTGTGCCACTGGACTCCGCACCTCAGGAACCTGTGG
ACCATCTCAAAGTGTACTTGAAGTACTTTTCT
TAAGGAAATACCGCAGGTTGAGGAGGCAAGCCGCTA
ATGTTGCTGCCCAAGTTGTCTATGCGAATTCCTT
GAGGCTATTGTGA

تصویر شماره ۳: توالی DNA ژن کدکننده پروتئین ROP13 در سویه RH توکسوپلازما



تصویر شماره ۴: بررسی بیان ژن کدکننده ژن ROP13 توکسوپلازما گوندیی در سلول‌های CHO با استفاده از روش ایمونوفلورسانس آنتی بادی (A): سلول‌های CHO ترانسفکت شده با پلاسمید خالی pcDNA3، (B): سلول‌های CHO ترانسفکت شده با پلاسمید pcROP13

و استفاده از آن‌ها در تولید و ساخت کیت‌های تشخیصی و هم‌چنین استفاده از آن به عنوان DNA واکسن بر علیه توکسوپلاسموزیس می‌باشد. امروزه، دست یابی به یک واکسن موثر و مقرون به صرفه جهت کاهش موارد ابتلا و مرگ و میر ناشی از بیماری و استفاده از پلاسمیدهای نو ترکیب در تشخیص و درمان و هم‌چنین طراحی و ساخت کیت‌های تشخیصی برای شناسایی عفونت و حتی افتراق عفونت حاد و مزمن دارای اهمیت می‌باشد (۹، ۱۴).

دلیمی و همکاران، ROP1 انگل توکسوپلاسمای گوندی را در وکتور PTZ57R/T کلون نمودند و برای ترانسفورماسیون از باکتری *E. coli* سویه TG1 استفاده نمودند. در این مطالعه، توالی ژن مورد نظر با توالی موجود در بانک جهانی ژن، همخوانی ۹۶ درصدی را نشان داد (۱۸). در مطالعه Pei-Yuan Wang و همکاران در ارتباط با کلون کردن ژن ROP13 انگل توکسوپلاسمای گوندی از وکتور Pvac جهت کلونینگ استفاده شده است (۱۲). در مطالعه حاضر، با تعیین توالی ژن ROP13 توکسوپلاسمای گوندی کلون شده در پلاسمید pTG19- و pCDNA3 و مقایسه آن با ژن موجود در بانک ژن جهانی، مشخص شد که قطعه ۱۲۰۳ جفت بازی در این پلاسمیدها به درستی کلون شده است. در برش آنزیمی نیز قطعه ۱۲۰۳ جفت بازی جدا شد که هم اندازه ژن ROP13 توکسوپلاسمای گوندی بوده و در حقیقت ساب کلون این ژن را در پلاسمید pCDNA3 تایید می‌کند. این نتایج حاکی از آن است کلون این ژن در پلاسمیدهای ذکر شده با موفقیت صورت گرفته و بیان ژن مذکور در سلول یوکاریوتیک CHO با استفاده از روش IFA نیز تایید شد. مهم‌ترین نکته در مطالعات مختلف مربوط به بحث‌های کلونینگ و توالی یابی،

استفاده از پلاسمیدهای مختلف و سوش‌های مختلف باکتریایی برای کلونینگ می‌باشد (۱۸). مطالعه ما نشان داد، پلاسمید pTG19-t و پلاسمید pCDNA3 به ترتیب به عنوان وکتورهای انتقالی و بیانی برای اولین بار برای کلون کردن ژن ROP13 مناسب هستند. هم‌چنین از سویه TOP10 باکتری *E. coli* جهت ترانسفورماسیون استفاده گردید. اخیراً در مطالعه دیگری نیز پلاسمیدهای pTG19-t و pCDNA3 برای کلونینگ و ساب کلونینگ ژن GRA14 توکسوپلاسمای گوندی مورد استفاده قرار گرفته است. نتایج این مطالعه نیز مناسب بودن این وکتورها را برای استفاده در کلونینگ نشان داد (۹). با توجه به این که کلون کردن و شناسایی ژن ROP13 در وکتورهای بیانی و انتقالی ذکر شده و رسیدن به آنتی ژن نو ترکیب ROP13 با موفقیت صورت گرفت، پس می‌توان از آن به عنوان مسیری برای تولید کیت‌های تشخیصی و DNA واکسن جهت پیش‌گیری از بیماری در حیوانات و افراد در معرض خطر به خصوص خانم‌های باردار و افراد دارای نقص سیستم ایمنی استفاده کرد (۱۷). در نهایت، می‌توان نتیجه گرفت که پلاسمیدهای نو ترکیب نویدگر آینده‌ای روشن در تهیه واکسن علیه بیماری‌های انگلی به خصوص توکسوپلاسموزیس خواهند بود.

سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان نامه خانم پریا علیزاده دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی می‌باشد که هزینه آن توسط مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز طی طرح مصوب به شماره IR.TBZMED.REC.1395.578 با کد اخلاق ۵/۴۳۷۷/د/۵ تامین شده است.

References

1. Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. Int J Parasitol 2009; 39(8): 895-901.
2. Daryani A, Sarvi S, Aarabi M, Mizani A, Ahmadpour E, Shokri A, et al. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in the Iranian general

- population: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop* 2014; 137: 185-194.
3. Dubey J, Jones J. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol* 2008; 38(11): 1257-1278.
 4. Ahmadpour E, Daryani A, Sharif M, Sarvi S, Aarabi M, Mizani A, et al. Toxoplasmosis in immunocompromised patients in Iran: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8(12): 1503-1510.
 5. Sharif M, Daryani A, Ebrahimnejad Z, Gholami S, Ahmadpour E, Borhani S, et al. Seroprevalence of anti-Toxoplasma IgG and IgM among individuals who were referred to medical laboratories in Mazandaran province, northern Iran. *J Infect Public Health* 2016; 9(1): 75-80.
 6. Costa-Silva TA, Meira CS, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chiocola VL. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* 2008; 120(3): 227-234.
 7. Daryani A, Sharif M, Dadimoghaddam Y, Souteh MBH, Ahmadpour E, Khalilian A, et al. Determination of parasitic load in different tissues of murine toxoplasmosis after immunization by excretory-secretory antigens using Real time QPCR. *Exp Parasitol* 2014; 143: 55-59.
 8. Hiszczyńska-Sawicka E, Li H, Xu JB, Olędzka G, Kur J, Bickerstaffe R, et al. Comparison of immune response in sheep immunized with DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* GRA7 antigen in different adjuvant formulations. *Exp Parasitol* 2010; 124(4): 365-372.
 9. Ahmadpour E, Sarvi S, Daryani A, Sharif M, Hashemi Souteh M-B, Mizani A, et al. Cloning and sequencing the plasmid encoding dense granule antigen 14 (GRA14) of *Toxoplasma gondii* RH strain. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; 24(112): 42-49 (Persian).
 10. 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): 123-134.
 11. Daryani A, Kalani H, Sharif M, Ziaei H, Sarvi S, Ahmadpour E. *Toxoplasma Gondii*: A Review of Excretory Secretory Antigens. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2013; 22(2): 220-232 (Persian).
 12. Wang PY, Yuan ZG, Petersen E, Li J, Zhang XX, Li XZ, et al. Protective efficacy of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 13 plasmid DNA vaccine in mice. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19(12): 1916-1920.
 13. Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 3th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.
 14. Kim K, Bülow R, Kampmeier J, Boothroyd JC. Conformationally appropriate expression of the *Toxoplasma* antigen SAG1 (p30) in CHO cells. *Infect Immun* 1994; 62(1): 203-209.
 15. Rahimi MT, Sarvi S, Sharif M, Abediankenari S, Ahmadpour E, Valadan R, et al. Immunological evaluation of a DNA cocktail vaccine with co-delivery of calcium phosphate nanoparticles (CaPNs) against the *Toxoplasma gondii* RH strain in BALB/c mice. *Parasitol Res* 2017; 116(2): 609-616.
 16. Kur J, Holec-Gąsior L, Hiszczyńska-Sawicka E. Current status of toxoplasmosis vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8(6): 791-808.
 17. Mateus-Pinilla NE, Dubey J, Choromanski L, Weigel RM. A field trial of the effectiveness

of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine. *J Parasitol* 1999; 85(5): 855-860.

18. Eslamirad Z, Dalimi A, GHAFARIFARD F,

Sharifi Z. Cloning rhoptry protein 1 (ROP1) gene of *Toxoplasma gondii* (RH) in expression vector. *Arch Razi Inst* 2008; 63(2): 11-17 (Persian).