JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره نهم، شماره دوم، ۱۳۹۲، پیاپی ۲۷: ۱۳۸-۱۲۹

کلونینگ و تعیین توالی ژن LACK در *لیشمانیا اینفانتوم* سویه ایران

سالومه شیرعلی[1*]، حمیدرضا حداد زاده[2]، مهدی محبعلی[3]، بهرام کاظمی[4و5]

۱. دانشجوی دوره دکترای انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۲. استاد گروه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳. استاد گروه انگل‌شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

۵- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۸ خرداد ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۲٤ تیر ۱۳۹۲

چکیده

لیشمانیوز احشایی سگ‌ها یک بیماری تک یاخته ای زئونوز است که به طور بالقوه در انسان‌ها و سگ‌ها کشنده است. در ایران این بیماری شایع است و توسط لیشمانیا اینفانتوم سویه استاندارد ایران leishmania infantum Lon49 ایجاد می‌شود. چندین پروتئین جهت واکسیناسیون مورد استفاده قرار گرفته است، یکی از این پروتئین‌ها، پروتئین LACK(Leishmania homologue for receptors for activated C kinase) با وزن مولکولی۳۶ کیلو دالتون است. با توجه به گسترش وسیع لیشمانیوز احشایی سگ‌ها در ایران در مطالعه حاضر کلونینگ مولکولی آنتی ژن محافظتی LACK لیشمانیا اینفانتوم سویه ایران جهت تولید پروتئین نوترکیب مؤثر مد نظر قرار گرفت. بدین منظور DNA ژنومیک لیشمانیا اینفانتوم سویه ایران استخراج و سپس به عنوان الگو جهت PCR استفاده شد. سپس محصول PCR قطعه ی LACK درون حامل pTZ57R/T کلون شد. پلاسمید نوترکیب استخراج و به وسیله آزمون‌های تعیین توالی، هضم با آنزیم‌های محدود کننده و PCR آزمایش شد. نتایج نشان داد که ژن LACK به درستی در حامل pTZ57R/T کلون شده است و همان طور که انتظار داشتیم قطعه، ۹۳۹ جفت بازی است. این مطالعه اولین گام جهت طراحی DNA واکسن بر پایه قطعه ی LACK لیشمانیا اینفانتوم سویه ایران به منظور بیان پروتئین نوترکیب جهت مطالعات بعدی است.

کلمات کلیدی: *لیشمانیا اینفانتوم، LACK، کلونینگ، واکسن.*

* نویسنده مسئول: سالومه شیرعلی

آدرس: گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. تلفن: ۶۱۱۱۷۰۰۰-۰۲۱

پست الکترونیک: s.shirali@ut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

لشمانیوز احشایی زئونوز به وسیله تک یاخته انگلی *لیشمانیا اینفانتوم* (=*لیشمانیا شاگازی*) ایجاد و توسط پشه خاکی منتقل می‌شود. این بیماری در مناطق وسیعی از مدیترانه، آسیا و آمریکای لاتین دیده شده است و در اغلب موارد سگ های اهلی اصلی ترین مخزن این بیماری بوده اند (۱۶و۱۷). لیشمانیوز احشایی سگ برای اولین بار توسط نیکول و کومت در سال ۱۹۰۸ در کشور تونس گزارش شد و پس از آن گزارشات فراوانی از نقاط مختلف جهان در مورد آن دیده می‌شود (۲۱). یکی از مشخص ترین علایم این بیماری در سگ ها که در کمتر از ۵۰٪ جمعیت میزبان دیده می‌شود، یک بیماری حاد با علائم مزمن پوستی- احشایی است (۱۷). در ایران مطالعات زیادی بر روی لیشمانیوز احشایی سگ‌ها صورت گرفته و با مطالعه بر روی نمونه‌های *لیشمانیای* جدا شده از سگ‌های مبتلا به لیشمانیوز احشایی در مناطق گوناگون ایران در تمام موارد *لیشمانیا اینفانتوم* شناسایی گردیده و تنها یک مورد از *لیشمانیا تروپیکا* شناسایی شده است. لذا گونه غالب *لیشمانیا* در ایران *لیشمانیا اینفانتوم* می‌باشد (۱۴).

با توجه به مشکلات مربوط به ریشه کنی انگل، مقاومت دارویی، عوارض جانبی ناشی از آلودگی قبلی و همچنین مسائل مربوط به کنترل ناقلین بندپا، به نظر می‌رسد تهیه یک واکسن کارآمد و ایمن بهترین راه حل برای کنترل لیشمانیازیز باشد (۱۸). جدیدترین نسل واکسن‌های *لیشمانیا* شامل پروتئین‌های نوترکیب و DNA واکسن کُدکننده این پروتئین‌هاست. در این حالت ژن کُدکننده کاندیدای واکسن در وکتور بیانی کلون می‌شود و DNA از طریق عضلانی و یا زیرجلدی تزریق گردیده و توسط سلول‌ها جذب و وارد هسته می‌شود. با وجود اینکه ممکن است جذب قطعه DNA کم باشد اما همین میزان کم جهت بر انگیختن هر دو پاسخ $CD8^+$ و $CD4^+$ کافی است (۱۲).

با وجودی که تاکنون واکسن تجاری علیه *لیشمانیا اینفانتوم* در دسترس نیست، اما چندین مولکول و آنتی ژن انگل برای طراحی واکسن، مطرح بوده و به فراوانی در مطالعات تحقیقاتی مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۸). یکی از این پروتئین‌ها که توجه بسیاری را در سال‌های اخیر به خود جلب نموده پروتئین LACK می‌باشد. LACK یک مولکول ۳۶ کیلودالتونی است که در اشکال پرومستیگوت و امستیگوت انگل شناسایی شده است. در مطالعات پیشین نشان داده شده که سلول-های T علیه LACK اینترلوکین ۴ تولید می‌کنند و در نتیجه باعث مقاومت علیه عفونت لیشمانیوز می‌شوند. این پروتئین یکی از ترکیب های اصلی برای طراحی واکسن بوده و به میزان بالایی بیان می‌شود (۱۵).

لذا مطالعه حاضر با هدف کلونینگ ژن LACK *لیشمانیا اینفانتوم* سویه ی ایران برای نخستین بار، به منظور تهیه DNA واکسن، جهت کنترل لیشمانیوز احشایی در سگ‌ها می‌باشد.

مواد و روش کار

مطالعه حاضر بر روی انگل *لیشمانیا اینفانتوم* سویه ایران leishmania infantum Lon49 تهیه شده از گروه انگل‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. انگل تا زمان انجام آزمایش در محیط کشت RPMI حاوی ۵٪ فتال و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین جی رشد داده شد و نگهداری گردید.

استخراج DNA

در ابتدا یک میلی لیتر از محیط RPMI حاوی پروماستیگوت سانتریفیوژ و سه بار با PBS شستشو داده شد سپس رسوب حاصله جهت استخراج DNA استفاده شد. استخراج DNA با استفاده از کیت (DNA

Archive of SID

www.SID.ir

extraction kit, MBST, Iran) و طبق دستورالعمل کیت بر روی پروماستیگوت‌های *لیشمانیا اینفانتوم* انجام شد. جهت تأیید استخراج، نمونه بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

تکثیر DNA با روش PCR و الکتروفورز بر روی ژل

به منظور افزوده سازی ژن LACK *لیشمانیا اینفانتوم* به روش PCR، محصول حاصل از استخراج DNA به عنوان الگو استفاده شد. PCR در واکنش‌های ۱۰۰ میکرولیتری با ترکیبات: آغازگرهای جلویی و برگشتی هر کدام ۲ میکرولیتر، dNTP به مقدار ۲ میکرولیتر، MgCl به میزان ۲ میکرولیتر، Taq پلیمراز به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، ۱۰ میکرولیتر بافر ، آب مقطر به مقدار ۷۹/۵ و ۱ میکرولیتر محصول استخراج DNA انجام شد.

توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن LACK به قرار زیر بود:

آغازگر جلویی، Lack F 5- ggatccA TGA ACT ACG AGG GTC ACC -3 با جایگاه برش برای آنزیم محدود کننده *Bam*HI.

آغازگر برگشتی، Lack R 5` aagcttTTA CTC GGC GTC GGA GAT GGA-3 با جایگاه برش برای آنزیم محدود کننده *Hind*III.

همچنین برنامه بکار برده شده جهت انجام PCR شامل ۵ دقیقه ۹۵ درجه سانتیگراد جهت واسرشتگی اولیه، ۴۵ ثانیه ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه ۶۸ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه ۷۲ درجه سانتیگراد (سه مرحله اخیر ۳۵ بار) و ۵ دقیقه ۷۲ درجه سانتیگراد جهت تکمیل نهایی ساخت بود.

پس از اتمام PCR محصول جهت مشاهده و تخمین اندازه بر روی ژل آگارز ۱٪ حاوی رنگ سایبرگرین مورد الکتروفورز قرار گرفت. همچنین جهت تخمین اندازه قطعه مورد نظر از نشانگر ۱۰۰ bp شرکت Vivantis استفاده شد.

خالص سازی محصول PCR

۱۰۰ میکرولیتر از محصول PCR جهت خالص سازی استفاده شد. خالص سازی محصول PCR برطبق دستورالعمل (PCR Purification kit, MBST, Iran) انجام شد. سپس جهت تأیید مراحل انجام شده محصول ایجاد شده بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد.

کلونینگ ژن LACK در پلاسمید pTZ57R/T

در این مطالعه جهت کلونینگ ژن LACK از کیت T/A cloning ساخت شرکت Fermentase (شماره کاتالوگ #K1214 ,#K1213، امریکا) استفاده شد. بدین منظور محصول خالص شده PCR در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد و کلیه مراحل اتصال به پلاسمید و ترانسفورماسیون یا انتقال در سلول باکتری بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. ترانسفورماسیون در سلول باکتری *Ecoli* سویه DH5α صورت گرفت. سپس محصول ترانسفورماسیون بر روی محیط کشت جامد LB حاوی ۱٪ آمپی سیلین کشت داده شد.

غربالگری کلون‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب

غربالگری پلاسمیدهای نوترکیب به سه روش PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی انجام شد.

PCR ژن LACK از روی پلاسمید نوترکیب

در این مرحله کلونی‌های رشد کرده حاصل از ترانسفورماسیون در محیط کشت جامد LB حاوی ۱٪ آمپی سیلین شماره گذاری شده و هریک از کلونی‌ها به صورت جدا گانه در فالکن‌های حاوی ۵ سی سی محیط کشت مایع LB حاوی ۱٪ آمپی سیلین کشت داده شد. سپس PCR طبق برنامه اولیه انجام شد با این

Archive of SID

www.SID.ir

تفاوت که در این مرحله به جای واکنش‌های ۱۰۰ میکرولیتری واکنش‌ها ۵۰ میکرولیتری بوده والگوی مورد استفاده جهت PCR، ۱ میکرولیتر از محیط کشت مایع LB- آمپی سیلین حاوی باکتری‌های رشد یافته بود. در نهایت محصول حاصل از PCR نمونه‌ها جهت تایید وجود قطعه LACK، بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد.

آنالیز آنزیمی

چنانچه پیش از این ذکر شد در ابتدای هر یک از توالی‌های آغازگرهای جلویی و برگشتی قطعه LACK در زمان طراحی آغازگرها، جایگاه برش آنزیم *Bam*HI در آغازگر جلویی و جایگاه برش آنزیم *Hind*III در آغازگر برگشتی قرار داده شده بود. از سویی در پلاسمید مورد استفاده در مطالعه حاضر (pTZ57R/T) اولین جایگاه برش در انتهای برگشتی این پلاسمید یعنی دقیقا" پس از خاتمه قطعه کلون شده LACK، جایگاه برش آنزیم *Bam*HI بود و بنابراین جهت آنالیز آنزیمی و تأیید کلون استفاده از آنزیم *Bam*HI کفایت می‌کرد و هر دو سمت قطعه با این آنزیم بریده شد.

به منظور انجام آنالیز آنزیمی در ابتدا استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (Plasmid extraction kit, MBST, Iran) انجام گردید. آنزیم *Bam*HI مورد استفاده جهت برش محصول شرکت Vivantis (شماره کاتالوگ RV1138، کشور مالزی) بود و واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتری محتوی ۱۶ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب، ۲ میکرولیتر آنزیم، ۱۰ میکرولیتر بافر ۱۰x و ۲۲ میکرولیتر آب به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. در نهایت جهت تأیید ژن LACK محصول حاصل بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد الکتروفورز قرار گرفت.

تعیین توالی

به منظور تعیین توالی قطعه کلون شده ی LACK، پلاسمید نوترکیب تولید شده به شرکت تکاپو زیست ارسال شد. بدین منظور از آغازگرهای جهانی M13F(-20) و M13R(-40) پلاسمید T/A استفاده گردید. در نهایت نتیجه ارسال شده توسط شرکت به وسیله بانک ژنی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast با توالی قطعه LACK مقایسه گردید.

نتایج

DNA استخراج شده از پروماستیگوت *لیشمانیا اینفانتوم* جهت تأیید بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شد و یک باند سنگین بر روی ژل مشاهده گردید که نشاندهنده DNA ژنومی انگل *لیشمانیا* می باشد (تصویر شماره ۱).

محصول حاصل از استخراج DNA به عنوان الگو جهت ساخت ژن LACK مورد استفاده قرار گرفت، همانطور که انتظار می‌رفت پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ تنها یک باند با وزن تقریبی ۹۳۹ جفت باز بر روی ژل دیده شد (تصویر شماره ۲).

پس از کشت محصول ترانسفورماسیون قطعه نوترکیب در سلول باکتری، بر روی محیط کشت LB حاوی ۱٪ آمپی سیلین، هفت کلونی باکتریایی رشد کردند. بنابراین جهت تفکیک کلونی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب از سایر موارد سه روش زیر صورت گرفت.

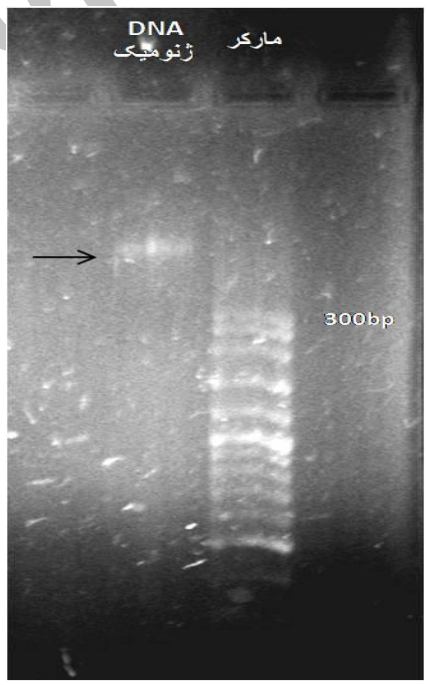
پس از انجام PCR از کلونی‌های رشد کرده با آغازگرهای ژن LACK و الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ دو کلونی باندی با وزن ۹۳۹ جفت باز را نشان دادند که نشاندهنده اتصال صحیح قطعه LACK در پلاسمید بوده و سایر کلونی‌ها از نظر وجود این قطعه منفی بودند (تصویر شماره ۳).

Archive of SID

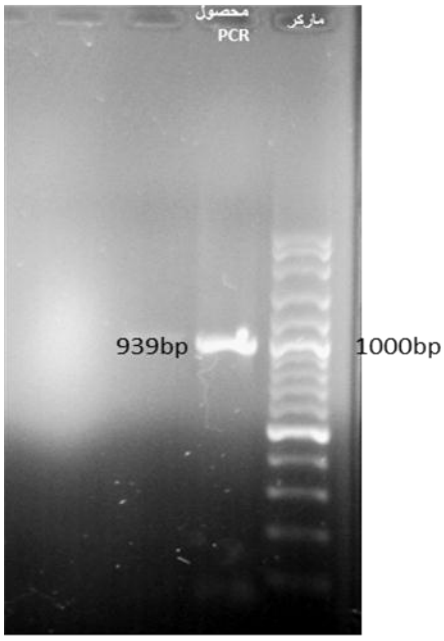
www.SID.ir

نتیجه حاصل پس از برش آنزیمی پلاسمید استخراج شده از کلونی‌های باکتریایی مثبت به روش PCR به وسیله آنزیم *Bam*HI و الکتروفورز محصول بر روی ژل آگارز موید قطعه LACK با وزن ۹۳۹ جفت باز است که نشان می‌دهد این قطعه در پلاسمید کلون شده است (تصویر شماره ۴).

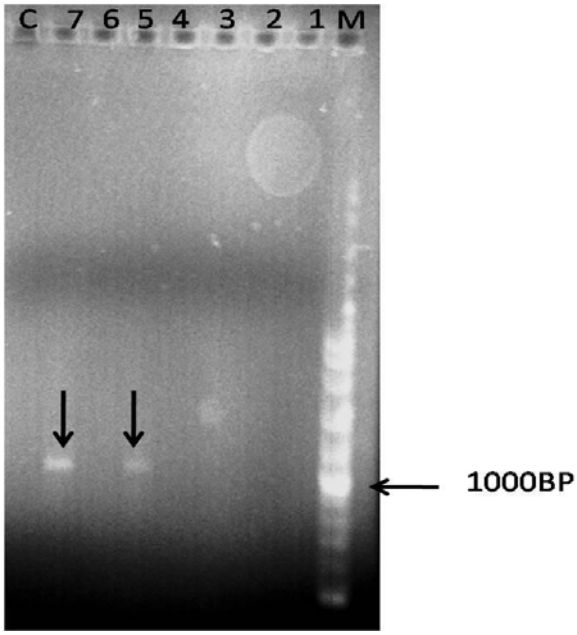
بررسی نتایج تعیین توالی ژن LACK *لیشمانیا اینفانتوم* کلون شده در پلاسمید pTZ57R/T با استفاده از سایت www.ncbi.nlm.nih.gov/blast و مقایسه با پروتئین LACK از *لیشمانیا اینفانتوم* (Accession no. U49695) نشان داد که قطعه ۹۳۹ جفت بازی در این پلاسمید کلون شده است و ژن کلون شده، پروتئین LACK از *لیشمانیا اینفانتوم* سویه ایران (Accession no. FJ555210) است.



تصویر شماره ۱: الکتروفورز محصول استخراج DNA بر روی ژل آگارز ۱٪
ستون اول مارکر یا نشانگر ۱۰۰bp
ستون دوم محصول استخراج DNA *لیشمانیا اینفانتوم* با وزن بالا

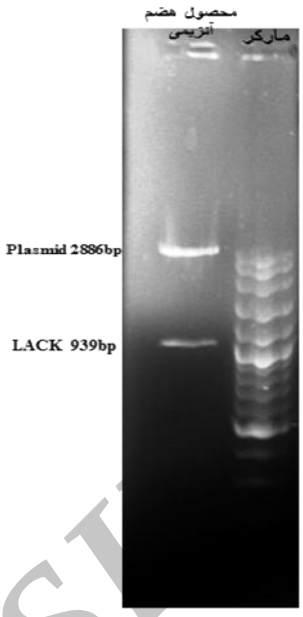


تصویر شماره ۲: الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪
ستون اول مارکر یا نشانگر ۱۰۰bp
ستون دوم محصول PCR با آغازگرهای ژن LACK *لیشمانیا اینفانتوم*



تصویر شماره ۳: PCR (CONTROL=C, MARKER=M, Product: 1-7)
الکتروفورز محصول PCR ۷ کلونی رشد کرده در محیط LB حاوی آمپی سیلین جهت تأیید کلونینگ بر روی ژل آگارز ۱٪
ستون اول مارکر یا نشانگر ۱۰۰bp
ستون دوم تا هشتم محصول PCR کلونی‌های ۱-۷
ستون نهم کنترل منفی

www.SID.ir



تصویر شماره ٤: الکتروفورز محصول هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTZ57R/T-LACK
جهت تأیید کلونینگ
ستون اول نشانگر ۱۰۰bp
ستون دوم محصول هضم آنزیمی : باند سنگین پلاسمید pTZ57R/T با اندازه ۲۸۸٦bp و باند سبک ژن LACK با اندازه 939bp

بحث

لیشمانیوز احشایی سگ ها (Canine Visceral Leishmaniasis) معمولاً به شکل عفونت سیستمیک مزمن بروز می کند که در اغلب موارد با مرگ حیوان همراه می‌شود. این بیماری علاوه بر اهمیت زیادی که در دامپزشکی دارد از نظر پزشکی و بهداشتی نیز از جایگاه قابل توجهی برخوردار است زیرا سگ مهمترین مخزن و منبع عفونت لیشمانیوز احشایی برای انسان به شمار می‌آید (۳).

استفاده از داروهای ضد *لیشمانیا* در ارتباط با سگ‌ها کارایی مشابه با انسان را ندارد و با محدودیت‌هایی همراه است. از طرفی تشخیص گروهی، حذف و یا درمان دارویی سگ‌های آلوده با وجود آنکه اثر خوبی در کاهش آلودگی در انسان داشته است، به دلیل مغایرت با قوانین حمایت از حقوق حیوانات و گران بودن مورد تأیید نیستند. همچنین کنترل ناقلین نیز در مناطق اندمیک موفقیت آمیز نبوده است (۹). بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به سادگی چرخه زندگی انگل و این حقیقت که بهبودی و درمان در آلودگی مجدد در بیمار دیده شده است، این احتمال داده می‌شود که واکسیناسیون شیوه مناسبی جهت کنترل این بیماری باشد (۷).

تاکنون انواع مختلفی از واکسن جهت کنترل این بیماری بکار گرفته شده است، از جمله واکسیناسیون با انگل زنده، کشته شده، آنتی ژن‌های خالص شده، آنتی ژن نوترکیب، باکتری زنده حاوی ژن نوترکیب *لیشمانیا* و واکسیناسیون ژنتیکی (۹). از بین انواع ذکر شده به نظر می‌رسد که واکسیناسیون ژنتیکی یا همان DNA واکسن به علت ایمنی زا بودن، حفاظت طولانی مدت در مقابل عفونت، ارزان، سریع و ساده بودن و همچنین القاء هر دو نوع پاسخ ایمنی هومورال و سلولی مؤثرتر از سایر انواع واکسن باشد (۸). از جمله واکسن‌های ژنی بکار رفته در مورد *لیشمانیا* می‌توان به DNA واکسن‌های کُدکننده مولکول‌های سیستئین پروتئیناز، A2، هیستون، TSA و LACK اشاره کرد.

پروتئین LACK وابسته به خانواده پروتئین‌های WD می‌باشد. این پروتئین‌ها در روند تکاملی حفاظت شده بوده و اعمال مهمی را کنترل می کنند، مانند انتقال پیام، ساخت RNA و کنترل چرخه سلولی (۱۳). این پروتئین در *لیشمانیا اینفانتوم* در نزدیکی کینتوپلاست قرار گرفته و به نظر می‌رسد با سکانس‌هایی از پروتئین‌های مسئول در همانند سازی DNA و سنتز RNA واکنش می‌دهد (۱۳). پروتئین LACK احتمالاً از تولید رادیکال‌های سمی اکسیژن در درون سلول جلوگیری کرده و همچنین تولید سایتوکاین‌های مربوط به فاز حاّد در ماکروفاژ را مهار می کند (۵).

Archive of SID

ویژگی‌های فوق سبب شده این پروتئین بتواند به عنوان یکی از پروتئین‌های کاندید واکسن در نظر گرفته شود لذا در بسیاری از کشورها مطالعات زیادی در زمینه ایمنی زا بودن این پروتئین صورت گرفته است.

بررسی ایمنی زایی پروتئین LACK *لیشمانیا اینفانتوم* در سگ توسط رامیرو و همکاران و *لیشمانیا ماژور* در مدل موش توسط گونزالو و همکاران نشان داد که تزریق DNA واکسن کُدکننده آنتی ژن LACK و سپس بوستر آن با واکسن نوترکیب با حامل ویروسی ایمنی خوبی ایجاد می‌کند (۱۰، ۱۱ و ۱۹)، همچنین اثر ایمنی زایی مطلوب DNA واکسن کُدکننده پروتئین LACK در ترکیب با چند آنتی ژن کاندید دیگر در تعدادی از مطالعات نظیر بررسی‌های انجام شده توسط جرجانی، بن‌هادج احمد، کارسون و رودریگوئز ثابت شده است (۱، ۴، ۶ و ۲۰).

از طرف دیگر تاپیا و همکاران نشان دادند استفاده از 1L-12 و 1L-18 در بهبود بخشیدن به ایمنی زایی آنتی ژن LACK *لیشمانیا ماژور* در موش نقش بسزایی داشته و به نظر می‌رسد یک راه مفید جهت مقاومت علیه این انگل باشد (۲۲).

پیش از این کلونینگ ژن LACK *لیشمانیا ماژور* سویه ایران جهت بررسی‌های ایمنی شناسی و ساخت واکسن نوترکیب توسط جرجانی و همکاران و همچنین حجازی و همکاران بررسی شده بود (۱و ۲). لذا در مطالعه حاضر با توجه به شیوع بالای لیشمانیوز احشایی و اهمیت زیاد این بیماری در ایران (۳) و همچنین ضرورت ساخت واکسن در جهت کنترل آن، کلونینگ ژن LACK *لیشمانیا اینفانتوم* سویه ایران leishmania infantum Lon49 در حامل پلاسمیدی انجام شد.

نتایج حاصل شده از تعیین توالی، هضم آنزیمی و PCR ژن LACK و بررسی آنها از طریق بانک ژنی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast و مقایسه نتایج بدست آمده با قطعه مورد نظر همه موید آن است که ژن LACK با اندازه ۹۳۹ جفت باز در پلاسمید pTZ57R/T کلون شده است. همچنین آغازگرهای طراحی شده اختصاصی ژن LACK می‌باشند.

لذا مطالعه حاضر به عنوان نخستین گام جهت طراحی DNA واکسن کُدکننده ژن LACK *لیشمانیا اینفانتوم* سویه ایران با موفقیت انجام شد. با توجه به مطالعات مرتبط انجام شده به نظر می‌رسد در مرحله بعد تولید پروتئین‌های نوترکیب برای ارزیابی کارآمدی ایمنی زایی DNA واکسن طراحی شده علیه لیشمانیوز احشایی در سگ و انسان مفید و کاربردی باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله حاضر از سرکار خانم امینی (کارشناس آزمایشگاه بخش انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) و گروه انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به خاطر همکاری صمیمانه و فراهم نمودن امکانات مورد نیاز برای پیشبرد این مطالعه سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

۱. جرجانی، ا.، غفاری فر، ف.، شریفی، ز.، دلیمی اصل، ع.، زهیر، م.ح. (۱۳۸۷). کلونینگ و توالی یابی ژن *Leishmania* homologue of receptors for activated C kinas (LACK) *لیشمانیا ماژور* سویه استاندارد ایرانی. *مجله علوم پزشکی مدرس*. دوره ۱۱، شماره ۳ و ۴، صفحات ۳۰-۱۹.

۲. حجازی، ح.، فولادوند، م.ع.، میرمحمدصادقی، ح.، کاظمی، ب.، صالحی، م. (۱۳۸۴). کلونینگ ژن کُدکننده پروتئین ۳۶ کیلودالتنی P36/LACK *لیشمانیا ماژور*. *مجله دانشکده پزشکی دانشگاه اصفهان*. شماره ۷۶، صفحه ۱۳.

Archive of SID

www.SID.ir

۳. محبعلی، م.، حمزوی، ی.، فلاح، ا.، زارعی، ذ. (۱۳۸۰). مطالعه لیشمانیوز احشایی در سگ های بعضی مناطق ایران و اهمیت بهداشتی آن. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۳، ۵۹-۵۵.

4. Ben Hadj Ahmed, S., Touihri, L., Chtourou, Y., Dellagi, K., Bahloul, Ch. (2009). DNA based vaccination with a cocktail of plasmids encoding immunodominant *Leishmania* (*Leishmania*) *major* antigens confers full protection in BALB/c mice. *Vaccine* **27**: 99-106.
5. Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R, McGwire, B.S., Chang, K.P., Mosser, D.M. (1986). Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunology* **155**:3102-11.
6. Carson, C., Antoniou, M., Ruiz-Argüello, M.B., Alcami, A., Christodoulou, B.V., Messaritakisb, I., Blackwelld, J.M., Courtenaya, O. (2009). A prime/boost DNA/Modified vaccinia virus Ankara vaccine expressing recombinant Leishmania DNA encoding TRYP is safe and immunogenic in outbred dogs, the reservoir of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vaccine* **27**: 1080-6.
7. Chappuis, F., Sundar, S.H., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W, Alvar, J., Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology* **5** 873-82.
8. Dunning, N. (2009). *Leishmania* vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. *Bioscience Horizons* **2**:73-82.
9. Gradoni, L. (2001). An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. *Veterinary Parasitology* **100**: 87-103.
10. Gonzalo, R.M., Ramón Rodríguez, J., Rodríguez, D., González-Aseguinolaza, G., Larragab, V., Mariano, E. (2001). Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL- 12 in combination with purified p36. *Microbes and Infection* **3**: 701-11.
11. Gonzalo, R.M., Realb, G.R., Rodrigueza, J., Rodrigueza, D., Heljasvaara, R., Lucasb, P., Larragac, V., Estebana, M. (2002). A heterologous prime-boost regime using DNA and recombinant vaccinia virus expressing the *Leishmania infantum* P36/LACK antigen protects BALB/c mice from cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*, **20**: 1226-31.
12. Handman, E. (2001). Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. *Clinical Microbiology Reviews* **14**: 229-43.
13. McGwire, B.S., O'Connell, W.A., Chang, D.M. (2002). Extracellular release of the glycosylphosphatidyleinositol (GPI) linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholypolysis. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 8802-9.
14. Mohebali, M., Hajjaran, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arshi, S.H., Zarei, Z., Akhoundi, B., Manouchehri Naeini, K., Avizeh, R., Fakhar, M. (2005). Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Veterinary Parasitology* **129**: 243-51.
15. Mugneau, E., Altare, F., Wakil, A.E., Zheng, S., Coppola, T., Wang, Z.E., Waldmann, R., Locksley, R.M., Glaichenhaus, N. (1995). Expression cloning of a protective *leishmania* antigen. *Science* **268**: 563.
16. Oliva, G., Foglia, Manzillo, V., Pagano, A. (2004). Canine

Archive of SID

www.SID.ir

M.M., Esteban, M. (2003). The combination of DNA vectors expressing IL-12 + IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK. *Microbes and Infection* **5**: 73-84.

leishmaniasis: evolution of the chemotherapeutic protocols. *Parassitologia* **46**: 231-4.

17. Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramicca, M., Pagano, A., Di Muccio, T., Gradoni, L. (2006). Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and Nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *Journal of Clinical Microbiology* **44:** 1318-22.
18. Rafati, S., Taheri, T., Alamian, A.H., Taghikhani, M., Fasel, N., Nakhaee, A.R. (2004). CP based vaccines for *L. Major* and *L. Infantum* infection. Leishmania congress of inistitute pasteure d'Iran.
19. Ramiro, M.J., Zárateb, J.J., Hankea, T, Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Esteban, M., Lucientesb, J.A., Castillob, J.A., Larragaa, V. (2003). Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* **21**: 2474-84.
20. Rodrıguez-Cortes, A., Ojeda, A., Lopez-Fuertes, L., Timon, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sanchez-Robert, E., Francino, O., Alberola, J. (2007). Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. Vaccine **25**: 7962-71.
21. Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology* **165**: 1-18.
22. Tapia, E., Pérez-Jiménez, E., López-Fuertes, L., Gonzalo, R., Gherardi,

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 9, Issue 2, 2013

Cloning and Sequencing of *Leishmania infantum* Iran Strain LACK Gene

Shirali, S.[1*], Haddadzadeh, H.R.[2], Mohebali, M.[3], Kazemi, B.[4,5]

1- PhD Student of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Public Health, Tehran Medical Sciences University, Tehran, Iran
4- Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5- Department of Biotechnology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received Date: 8 June 2013 *Accepted Date: 15 July 2013*

Abstract

*Canine visceral leishmaniasis is a zoonosis protozoan disease that is potentially fatal to humans and dogs. In Iran, this disease is common and it is caused by Leishmania infantum Iranian standard strain (MCAN/IR/07/Moheb-gh)**.** Several proteins are used for vaccination, one of them is LACK (Leishmania homologue for receptors for activated C kinase), a 36 KD protein. Because of the wide spread of canine visceral leishmaniasis in Iran, in this study molecular cloning of the LACK protective antigen of Leishmania infantum Iran strain was considered to produce an effective recombinant protein. Therefore, Genomic DNA of Leishmania infantum was extracted and used as a template for PCR test, Then, PCR product of the LACK was cloned into pTZ57R/T vector. Recombinant plasmid was extracted and analyzed by sequencing, restriction enzyme digestion and PCR test. The results showed that LACK gene was correctly cloned into pTZ57R/T vector and as expected it was 939bp. This study was the first step for designing a DNA vaccine based on LACK Leishmania infantum Iran stain for expression recombinant protein for subsequent studies.*

Keywords: *Leishmania infantum, LACK, Cloning, Vaccine.*

**Corresponding author: Shirali, S.*
Address: PhD Student of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Tel: 021- 61117000
Email: s.shirali@ut.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir