کلونینگ و بیان ژن k26 لیشمانیا اینفانتوم در E.coli و ارزیابي پتانسیل آن در تشخیص لیشمانیوز احشایي

صفر فرج نیا* [۱و۲]، بهروز دربانی[۱]، حسین بابائي[۱و۳]، محمود تورچي[۴]، شهرام عبدلي اسکوئي [۵]، محمد مهدي گویا[۶]، جعفرمجیدي[۵]، آیلار نخلبند[۲]، لیلا محمد نژاد[۲]، نسرین میرصمدي[۷] و زیبا حق شناس[۵]

[۱] مرکز تحقیقات کاربردي داروئي، دانشگاه علوم پزشکي تبریز، [۲] مرکز تحقیقات بیوتکنولوژي، دانشگاه علوم پزشکي تبریز، [۳] دانشکده داروسازي، دانشگاه علوم پزشکي تبریز[۴] دانشکده کشاورزي دانشگاه تبریز،[۵] دانشکده پزشکي، دانشگاه علوم پزشکي تبریز، [۶] دانشکده پزشکي، دانشگاه علوم پزشکي ایران

[۷] آزمایشگاه مرکزي استان، دانشگاه علوم پزشکي تبریز

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۲/۹، تاریخ پذیرش: ۸۵/۳/۱۶

Cloning and expression of *Leishmania infantum* K26 antigen in *E. coli* and evaluation of its potential for serodiagnosis of visceral leishmaniasis

Farajnia S. * [1, 2], Darbani B. [1], Babaei H. [1,3], Toorchi M. [4], Abdoli Oskouei Sh. [5], Gooya M.M. [6], Majidi J. [1], Nakhlband A. [2], Mohammadnegad L. [2], Mirsamadi N., [7], Hagshenas Z. [5]

[1] Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Science, [2] Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Science, [3] School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Science, [4] Faculty of Agriculture, University of Tabriz, [5] Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Science, [6] Faculty of Medicine, Iran University of Medical Science, [7] Central Laboratory , Tabriz University of Medical Science

Received: 2006/2/28 , Accepted: 2006/6/16

Objectives: The objective of this study was preparation and evaluation of recombinant K26 antigen of Leishmania infantum (L. infantum) for serodiagnosis of visceral leishmaniasis (VL) in endemic regions of Iran. **Methods:** Genomic DNA was extracted from L. infantum promastigotes by phenol-chloroform method and used for PCR amplification of k26 gene. The PCR product was purified, cloned into the Bluescript vector and subjected to DNA sequencing. For production of recombinant K26 protein, the insert was removed by restriction digestion, subcloned into the pQE-80L vector and expressed in E. coli. The recombinant protein was purified by Ni-NTA column and used for evaluation of response of VL patients by immunoblotting. **Results:** PCR amplification of K26 gene using L. infantum genomic DNA as a template was resulted in amplification of a 756 bp fragment. Cloning and sequencing of amplified fragment showed that there is a 98 % homology to L. chagasi and 95 % to L. donovani k26 gene sequence. Recombinant expression and purification of L. infantum K26 gene produced a highly pure protein appeared as a 45 kDa band in SDS-PAGE analysis. Western blot analysis showed that the sera from visceral leishmaniasis patients contain a high titer of antibody against K26 antigen. **Conclusion:** Western blot analysis using purified recombinant antigen showed that K26 antigens are recognized by sera from VL patient due to L. infantum and that this antigen can be exploited for serodiagnosis of VL. EMRO/tdr Grant SGS 05/95.

Key words: *Leishmania Infantum, Recombinant k26 antigen, Serodiagnosis.*

زمینه و هدف: هدف این مطالعه تهیه آنتي ژن K26 لیشمانیا اینفانتوم بصورت نوترکیب جهت کاربرد آن در تشخیص سرولوژیک لیشمانیوز احشایي بود. **روش ها:** لیشمانیا اینفانتوم سویه بومي ایران کشت داده شده و DNA ژنومي آن استخراج و در واکنش زنجیره اي پلیمراز براي تکثیر قطعه ژن k26 مورد استفاده قرار گرفت. محصول PCR تخلیص گردیده در حامل pBluescript کلون گردید. کلونهاي مثبت از طریق تهیه نقشه برشي و تعیین توالي تائید گردیدند. جهت بیان ژن k26 در باکتري E. coli، ژن کلون شده از طریق هضم آنزیمي ازحامل pBluescript جدا گردیده و در حامل pQE-80L ساب کلون گردید. سازه حاصل سپس در باکتري E. coli سویه DH5a ترانسفورم گردیده تولید پروتئین نوترکیب از طریق افزودن Isopropyl-b-D-thiogalactoside (IPTG) القا گردید. نهایتا پروتئین k26 نوترکیب با استفاده از ستون جذبي نیکل (Ni-NTA) تخلیص گردیده و براي بررسي پاسخ بیماران با روش وسترن بلاتینگ مورد استفاده قرار گرفت. **یافته ها:** واکنش زنجیره اي پلیمراز روي DNA لیشمانیا اینفانتوم با پرایمرهاي طراحي شده بر اساس ژن K26 لیشمانیا شاگاسي موجب تکثیر قطعه اي با اندازه ۷۵٦ جفت باز گردید. قطعه تکثیر شده در حامل pBluescript کلون گردیده و تهیه نقشه برشي و تعیین توالي صحت کلونهاي بدست آمده را تایید نمودند. بررسي تشابه توالي ژن کلون شده با توالیهاي موجود در بانکهاي ژني نشان داد که ژن K26 لیشمانیا اینفانتوم داراي ۹۸% هومولوژي با ژن K26 لیشمانیا شاگاسي و ۹۵% هومولوژي با ژن K26 لیشمانیا دونووانی مي باشد. بیان ژن کلون شده در E. coli با استفاده از حامل pQE-80L بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایي با پروتئین نوترکیب تخلیص شده با روش ایمونوبلاتینگ نشان داد که سرم بیماران داراي تیتر بالایي از آنتي بادي علیه آنتي ژن K26 هستند. **نتیجه گیري:** نتایج این مطالعه نشان میدهد که آنتي ژن K26 نوترکیب تهیه شده از حساسیت و ویژگي بالایي براي شناسایي عفونت با لیشمانیا اینفانتوم برخوردار بوده و لذا این آنت موجب تولید پروتئین نوترکیب K26 در مقادیر بالا گردید که بصورت باند غلیظي در نمونه هاي پس از القا در ژل SDS-PAGE نمایان گردید. بررسي واکنش سرمي ژن میتواند براي تشخیص سرولوژیک لیشمانیوز احشایي مورد استفاده قرار گیرد.

واژه هاي کلیدي: *لیشمانیا اینفانتوم، آنتي ژن k26 نوترکیب، تشخیص سرولوژیک.*

*نویسنده مسئول: دکتر صفر فرج نیا، استادیار بیوتکنولوژي، مرکز تحقیقات کاربردي داروئي، دانشگاه علوم پزشکي تبریز، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژي، دانشگاه علوم پزشکي تبریز، تلفن: ۰۹۱۴۳۰۱۸۵۸۹، نمابر: ۳۳٦۳۲۳۱ -۰۴۱۱

**Corresponding Author: Dr Safar Farajnia, Assistant Professor of Biotechnology , Drug Applied Research Center & Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tel: 09143018589; Fax:0411- 3363231; E-mail: farajnias@tbzmed.ac.ir*

۱- مقدمه

ليشمانيوز يک بيماري عفوني زونوتيک با انتشار جهاني است که توسط انگلهاي تک ياخته اي از جنس ليشمانيا ايجاد ميشود. ليشمانيوز احشايي شديد ترين شکل بيماري ليشمانيوز بوده و موارد علامت دار بيماري درصورت عدم درمان در ٪۱۰۰ موارد منجر به مرگ ميشود. بيش از دو ميليون نفر از مردم جهان در ۴۷ کشور به ليشمانيوز احشايي مبتلا بوده و سالانه ۵۰۰ هزار مورد جديد از بيماري گزارش مي شود (۱). ايران نيز جزو مناطق اندميک ليشمانيوز احشايي بوده و استانهاي آذربايجان شرقي، اردبيل و فارس کانونهاي اندميک بيماري را در کشور تشکيل ميدهند. عامل بيماري در اين مناطق ليشمانيا اينفانتوم بوده و اغلب بيماران را افراد زير ۱۵سال تشکيل ميدهند. اين بيماري يک بيماري زونوتيک بوده و سگ مهمترين مخزن بيماري بشمار مي رود. روشهاي تشخيص آزمايشگاهي ليشمانيوز احشايي شامل روشهاي پارازيتولوژيک، سرولوژيک و مولکولي ميگردد (۲). روشهاي پارازيتولوژيک يک روش تهاجمي بوده و نياز به پونکسيون مغز استخوان يا گرفتن بيوپسي از کبد، طحال و غدد لنفاوي براي مطالعه از طريق کشت يا آزمايش مستقيم دارد. اين روشها با مشکلات و خطرات متعددي براي بيمار همراه بوده و اغلب از حساسيت کافي برخوردار نيستند. تشخيص مولکولي به روش PCR و از نمونه هاي خون بعلت تجمع انگل در مغز استخوان، کبد و طحال داراي حساسيت پائيني است (۳). روش سرولوژيک يک روش غير تهاجمي بوده و از مزاياي سهولت، سرعت و امکان راه اندازي در مناطق بومي برخوردار مي باشد اما حساسيت و ويژگي اين روش وابستگي بالايي به نوع آنتي ژن مورد استفاده در تست دارد. روش سرولوژيک معمول در اغلب آزمايشگاهها روش آزمايش آگلوتيناسيون مستقيم (Direct Agglutination Test, DAT) مي باشد که در آن از انگل کامل (Whole cell) بعنوان آنتي ژن استفاده مي گردد. اما وجود واکنشهاي مثبت کاذب بعلت واکنشهاي متقاطع و عدم توانايي افتراق عفونت اخير با عفونت در گذشته بعلت بقاء طولاني مدت آنتي بادي هاي مربوطه باعث کاهش کارائي اين روش مي گردد (۴). مطالعات در زمينه بهبود روش تشخيص سرولوژيک منجر به شناسايي آنتي ژن K39 در دهه گذشته گرديده (۵) و نشان داده شد که اين آنتي ژن از حساسيت و ويژگي بالايي در تشخيص ليشمانيوز احشايي برخورداراست. اما کارائي آن در شناسايي صحيح عفونتها بويژه عفونتهاي بدون علايم در کشورهاي مختلف متغير بوده است (۶). آنتي ژن K26 پروتئيني است که در سال ۱۹۹۹ در ليشمانيا شاگاسي شناسايي گرديد و نشان داده شد که سرم بيماران داراي تيتر بالايي از آنتي بادي عليه اين آنتي ژن هستند (۷). مطالعات اخير نشان دادند که کارايي اين آنتي ژن در تشخيص عفونتهاي بدون علايم حتي بالاتر از K39 بوده و نتايج آن از ارزش پيشگويي (Prognostic value) بالايي برخوردار است (۸). در مطالعه اي که اخيرا براي مقايسه پتانسيل تشخيصي آنتي ژنهاي rK39، rK26 و rK9 بر روي سگهاي آلوده و سالم انجام گرديد نشان داده شد که تست اليزا با آنتي ژن rK26 داراي حساسيت و ويژگي ٪۱۰۰ مي باشد (۸،۹). آنتي ژن K26 از گونه هاي ليشمانيا شاگاسي و ليشمانيا دونووواني جداسازي و مورد مطالعه قرار گرفته است اما اطلاعاتي در مورد اين آنتي ژن در ليشمانيا اينفانتوم و پاسخ بيماران مربوطه عليه اين آنتي ژن وجود ندارد. هدف مطالعه حاضر تهيه پروتئين K26 نوترکيب ليشمانيا اينفانتوم و ارزيابي پتانسيل آن در تشخيص ليشمانيوز احشايي در مناطق اندميک ايران بوده است. براي اين منظور ژن k26 ليشمانيا اينفانتوم از طريق PCR تکثير گرديده با کلونينگ در وکتور بياني و ترانسفورم کردن در E. coli بيان گرديد. نهايتا پروتئين نوترکيب تخليص گرديده براي ارزيابي پاسخ بيماران مورد استفاده قرارگرفت.

۲- مواد و روش ها

۲-۱: تکثير ژن **k26** ليشمانيا اينفانتوم **(Li k26)** با **PCR**

پروماستيگوتهاي ليشمانيا اينفانتوم سويه بومي ايران (سويه Mon-1) در محيط RPMI-1640 (سيگما) کشت داده شده و DNA ژنوميک آن با روش فنل کلروفرم استخراج گرديد (۱۰). DNA استخراج شده به همراه پرايمرهاي F1 (5’-CGGGATCCATGGGAGCCTACTGCACGAAG-3’) و R1 (5’-TTCGAATTCGTTCCCGGCAACCTGCTC-3’) که بر اساس توالي ژن k26 گزارش شده از L. chagasi، (accession number AF131228) طراحي گرديده بود در واکنش PCR وارد گرديد.

واکنش PCR حاوي ۴۰۰ ميکرومولار dNTPs، ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنوميک، ۲/. ميکرومولار از هرکدام از پرايمرها و يک واحد از آنزيم pfu DNA polymerase (Fermentas) بوده و برنامه زير براي تکثير قطعه مورد نظر اجرا گرديد: دناتوراسيون اوليه در ۹۴ درجه ساتيگراد براي ۴ دقيقه که بعد با ۹۴ درجه براي يک دقيقه، ۶۲ درجه بمدت ۴۵ ثانيه و ۷۲ درجه براي ۱ دقيقه براي ۳۰ سيکل تکرار گرديد.

۲-۲: کلونينگ و تعيين توالي ژن **Li k26**

محصول PCR با استفاده از کيت تخليص پلاسميد (Roche) تخليص گرديده با آنزيمهايBamHI و EcoRI هضم گرديد. اين قطعه سپس همراه با حامل pBluescript که قبلا با آنزيمهاي فوق هضم شده بود در واکنش ligation وارد گرديده و محصول آن

بروش شوك دمائي به E. coli سويه Top 10f' ترانسفورم گرديد. كلونهاي مختلف پس از استخراج پلاسميد بوسيله برش با آنزيمهاي BamHI و EcoRI براي داشتن اينسرت غربال گرديدند. براي تعيين توالي ژن Li k26، پلاسميد مربوطه از يک كلون داراي اينسرت تخليص شده و براي تعيين توالي به شركت پرايم ايتاليا ارسال گرديد.

۲-۳: بيان ژن Li k26 در E. coli

براي بيان ژن در E. coli از وكتور pQE-80L استفاده گرديد. براي اين منظور ژن Li k26 ابتدا از طريق برش با آنزيمهاي BamHI و PstI از حامل pBluescript جدا شده و در وكتور pQE-80L كه قبلا با آنزيمهاي فوق هضم شده بود ساب كلون گرديد. سپس سازه ژني pQE-80L-Lik26 به باكتري E. coli DH5α ترانسفورم گرديده پس از كشت بيان پروتئين نوتركيب با افزودن IPTG القا گرديد. سلولها سپس در ساعات مختلف پس از القا جمع آوري گرديده و بيان پروتئين از طريق الكتروفورز در ژل SDS-PAGE (۱۱) آناليز گرديد.

٤-۲: تخليص پروتئين LiK26 نوتركيب

براي اين منظور سلولهاي E. coli DH5α حاوي سازه بياني در حجم ۵۰۰ ميلي ليتر كشت داده شده پس از جمع آوري از طريق حل كردن در بافر ليز (300mM NaCl ، 50mM NaH2PO4، pH=8) و سونيكاسيون ليز گرديدند. سوپ سلولي سپس در ستون Ni-NTA (Qiagen) وارد گرديده و پس از شستشوهاي متعدد پروتئين نوتركيب از طريق وارد كردن بافر elution حاوي ۲۵۰ ميلي مولار ايميدازول آزاد گرديد.

۵-۲: وسترن بلاتينگ

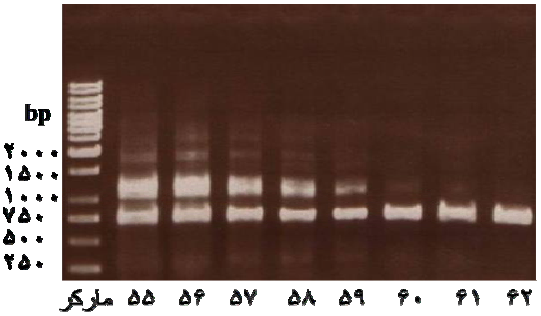
پروتئين نوتركيب تخليص شده در ژل SDS-PAGE (۱۰%) الكترو فورز گرديده و با روش semidry blotting به غشا نيتروسلولز منتقل گرديد (۱۲).

غشا با افزودن۳% BSA (Bovine Serum Albumin) در PBS براي يک ساعت بلاک گرديده سپس با سرم بيماران مبتلا به ليشمانيوز احشايي و افراد سالم دررقت ۱:۲۰۰ براي يک ساعت مجاور گرديد. پس از انجام شستشو غشا با آنتي هيومن IgG كونژوگه با پراكسيداز بمدت يكساعت انكوبه شده و واكنش با افزودن سوبستراي DAB (Sigma) مورد بررسي قرار گرفت.

۳- نتايج

۱-۳: تكثير ژن k26 ليشمانيا اينفانتوم با PCR

پس از بهينه سازي هاي لازم از نظر دماي اتصال پرايمرها، پرايمرهاي طراحي شده بر روي ژن k26 ليشمانيا شاگاسي، قطعه اي بطول ۷۵۶ باز را از ژنوم ليشمانيا اينفانتوم تكثير نمود (تصوير ۱). همانطور كه در تصوير ۱ ديده مي شود PCR در دماي اتصال پرايمر بالاتر از ۵۹ درجه سانتي گراد موجب تكثير اختصاصي قطعه اي در اندازه مورد انتظار گرديده است.



تصوير ۱: گراديان دمايي ۶۲-۵۵ درجه سانتي گراد براي تكثير ژن K26 ليشمانيا اينفانتوم با PCR. تكثير در دماي بالاتر از ۶۰ درجه منجر به توليد محصول اختصاصي در اندازه مورد انتظار (حدود ۷۵۰ جفت باز) گرديده است.

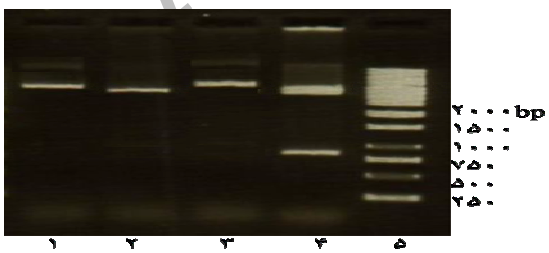
۲-۳: كلونينگ و تعيين توالي ژن k26 ليشمانيا اينفانتوم

با توجه به پيش بيني جايگاههاي برش آنزيمي BamHI و EcoRI در پرايمرهاي طراحي شده، از برش با آنزيمهاي فوق براي كلونينگ در حامل Bluescript استفاده گرديد.

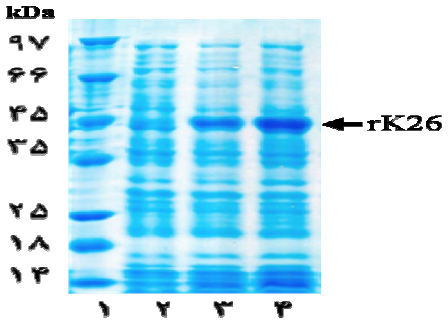
كلونهاي بدست آمده از طريق هضم با آنزيمهاي EcoRI و BamHI مورد بررسي قرار گرفته و چندين كلون حاوي اينسرت شناسايي گرديد. جهت تعيين توالي ژن K26 ليشمانيا اينفانتوم يک كلون مثبت تعيين توالي گرديده و توالي بدست آمده در بانک ژني NCBI ثبت گرديد (accession number DQ192034). مقايسه توالي ژن K26 ليشمانيا اينفانتوم با توالیهاي موجود در بانكهاي اطلاعاتي نشان داد كه كه ژن k26 در گونه ليشمانيا اينفانتوم داراي ۹۸% هومولوژي با ليشمانيا شاگاسي و ۹۵% هومولوژي با ليشمانيا دونووانی مي باشد.

۳-۳: بيان ژن Li k26 در E. coli

براي توليد پروتئين نوتركيب k26 ليشمانيا اينفانتوم، ژن مربوطه در وكتور بياني pQE-80L ساب كلون گرديد (تصوير ۲).



تصوير ۲: كلونينگ ژن k26 در وكتور pQE-80L.
۱- وكتور pQE بدون اينسرت، قبل از برش آنزيمي
۲- وكتور pQE بدون اينسرت ، بعد از برش آنزيمي با BamHI و pST I
۳- كلون pQE-k26 قبل از برش آنزيمي
۴- كلون pQE-k26 بعد از برش آنزيمي با BamHI وpST I
۵- ماركر وزن مولكولي

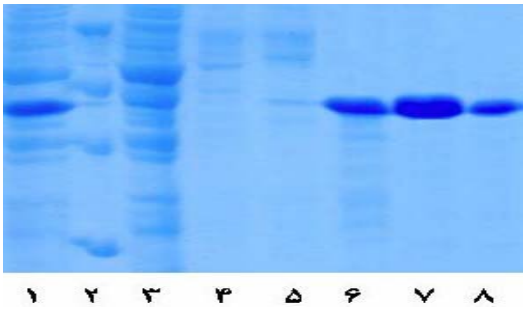


تصوير ٣: بيان ژن k26 در E. coli. پروتئين بيان شده بصورت باند واضحي در محدوده ۴۵ كيلو دالتون ديده ميشود.
۱- ماركر وزن مولكولي (بر حسب كيلودالتون)
۲- كلون pQE-k26 ، قبل از القا
۳- كلون pQE-k26 ، دو ساعت بعد از القا
۴- كلون pQE-k26 ، چهار ساعت بعد از القا

همان طور كــه در تــصوير ٢ ديده مي شود برش با آنزيم هاي BamHI و PstI باعث آزاد شدن اينسرت از كلونهاي مثبت گرديده است. القا كشت E. coli تــرانسفورم شده با سازه فوق جهت توليد پروتئين نوتركيب نشان داد كه سازه ژنــي فوق قادر به بيان ميزان بالايي از پروتئين K26 است كه بصورت باندي قوي در نمونه هاي پس از القا در ژل SDS-PAGE ديده ميشود (تصوير٣).

٤-٣: تخليص پروتئين **LiK26** نوتركيب

با توجه به پيش بيني 6His-tag در انتهاي N- ترمينال پروتئين K26 نوتركيب، از روش كروماتوگرافي با رزين Ni-NTA براي خالص سازي استفاده گرديد. بررسي فراكسيونهاي مختلف با SDS-PAGE نشان داد كه تخليص با روش فوق منجر به خلوص بسيار بالا گرديده است (تصوير۴).



تصوير ۴: تخليص پروتئين K26 نوتركيب با استفاده از ستون Ni- NTA.
۱- نمونه استخراجي قبل از ستون
۲- ماركر وزن مولكولي
۳- عبوري ستون (Flow through)
۴- شستشوي اول
۵- شستشوي دوم
۶- پروتئين رها شده از ستون با ايميدازول ۵۰ ميلي مولار
۷ و ۸ پروتئين رها شده از ستون با ايميدازول ۲۵۰ ميلي مولار

٥-٣: بررسي پاسخ هومورال بيماران مبتلا به ليشمانيوز احشايي عليه آنتي ژن **K26**

براي بررسي پاسخ هومورال عليه آنتي ژن K26 در بيماران مبتلا به عفونت با ليشمانيا اينفانتوم از تكنيک وسترن بلاتينگ استفاده گرديد. اين آزمايش نشان داد كه سرم كليه بيماران مبتلا به لشمانيوز احشايي داراي تيتر بالايي از آنتي بادي از نوع IgG عليه اين آنتي ژن هستند كه بصورت باندي قوي در وسترن بلات ديده ميشود در حالي كه سرم افراد سالم هيچ واكنشي را با اين آنتي ژن نشان نمي دهند (تصوير ٥).

تصوير ٥: وسترن بلاتينگ نمونه هاي سرم افراد بيمار و سالم با آنتي ژن K26 نوتركيب. همانطور كه در تصوير ديده ميشود. سرم بدست آمده از بيماران قادر به شناسايي آنتي ژن K26 نوتركيب بوده كه بصورت باند واضحي در محدوده مورد نظر ديده مي شود. در حالي كه سرم افراد سالم واكنشي را با اين آنتي ژن نشان نمي دهند.

٤- بحث

يكي از ويژگيهاي بارز ليشمانيوز احشايي هيپر گاماگلوبولينمي و توليد آنتي بادي عليه آنتي ژنهاي مختلف ليشمانيا است. اين ويژگي براي تشخيص بيماري با روشهاي سرولوژيک مورد بهره برداري قرار گرفته است (١٣). روشهاي سرولوژيک مختلفي براي تشخيص ليشمانيوز احشايي توسعه داده شده كه در آنها از فرآورده هاي آنتي ژنيک مختلفي استفاده شده است

(۱۴). استفاده از آنتي ژنهاي whole cell يا آنتي ژن هاي خام (crude antigens) بعلت واکنشهاي متقاطع اغلب از ويژگي (specificity) کافي برخوردار نبوده و همچنين تکرار پذيري پائيني دارند (۱۵). استفاده از آنتي ژنهاي نوترکيب در تشخيص سرولوژيک بيماريهاي مختلف مورد استفاده قرار گرفته و نشان داده شده است که آنتي ژن تهيه شده با اين روش داراي خلوص بالايي بوده و دقت و تکرارپذيري بالايي دارند. آنتي ژن K26 نوترکيب بعد از آنتي ژن rK39 مهمترين آنتي ژني است که براي تشخيص سرولوژيک ليشمانيوز احشايي مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶). مشابه آنتي ژن K39، آنتي ژن K26 نيز داراي دومن هاي تکراري بوده و لذا ايمونوژن قوي براي لمفوسيت هاي B محسوب ميشود. اما مطالعات در مورد آنتي ژن k26 به ليشمانيوز دنياي جديد محدود بوده و گزارشي در مورد ويژگيهاي اين آنتي ژن در گونه هاي ليشمانيوز دنياي قديم وجود ندارد. در اين مطالعه ژن مربوط به آنتي ژن K26 ليشمانيا اينفانتوم کلون و تعيين توالي گرديد. مقايسه توالي نوکلئوتيدي ژن K26 ليشمانيا اينفانتوم با ژن همولوگ در گونه هاي ليشمانيا شاگاسي و ليشمانيا دونووواني نشان ميدهد که توالي اين ژن در حد بالايي در گونه هاي متعلق به دنياي قديم و جديد حفظ شده است. هر چند نقش بـــيولوژيک پروتئين K26 در ليشمانياها مشخص نشده اما حفاظت بالاي توالي اين ژن در گونه هاي مختلف نشان از اهميت بيولوژيک احتمالي اين پروتئين دارد. جهت توليـــد پـــروتئين نوترکيب K26 از بيان ژن مربوطه در E .coli استفاده گرديد. نتايج اين مطالعه نشان مي دهد که مقادير بالايي از آنتي ژن K26 محلول و با خلوص بالا با اين روش قابل تهيه مي باشد اين نـتايج با يافته هاي Ajay و همکاران (۷) سازگار مي باشد.

بررسي واکنش سرم بيماران مبتلا به ليشمانيوز احشايي با آنتي ژن K26 نـــوترکيب نشان مي دهد که ســـرم بيماران داراي آنتي بادي عليـه اين آنتي ژن مي باشد که بصورت باندي قوي در وسترن بـــلات ديده مي شود. اين نتايج با يافته هاي Rosario و همکاران (۸) و همچنين Rosati و همکاران (۹) در مورد آنتي ژن K26 سازگاري داشته و نشان مي دهد که پروتئين K26 يک پروتئين ايمونوژنيک بوده و موجب القا پاسخ آنتي بادي در بيماران مبتلا مي گردد.

۵- نتيجه گيري

نتايج مطالعه حاضر نشان مي دهد که آنتي ژن K26 نوترکيب از ارزش تشخيصي بـــالايي برخوردار بوده و مي تواند براي تشخيص سرولوژيک بيماري ليشمانيوز احشايي ناشي از ليشمانيا اينفانتوم مورد استفاده قرار گيرد.

٦- تشکر و قدرداني

نويسندگان مقاله لازم مي دانند از همکاريهاي آقايان دکتر عباسقلي حسين زاده پورفيض و دکتر محمد ابراهيم رهباني از بيمارستان کودکان تبريز بخاطر همکاري در معرفي بيماران تشکر نمايند.

ايـــن پژوهش با حمايت مالي مرکز تحقيقات کاربردي داروئي دانشگاه علوم پزشکي تبريز و اداره مديترانه شرقي (EMRO) سازمان بهداشت جهاني، گرانت SGS05-95، به انجام رسيده است.

7- References:

1. WHO. Control of the Leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. Geneva. World Health Organization, Technical Report Series, 1990, no. 793.
2. Palma G., Gutierrez Y. Laboratory diagnosis of Leishmania. Clinics in laboratory medicine, 1991, 11: 909-22.
3. Singh S., Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis, Symposium, 2003, 49: 55-60.
4. Zijlstra E.E., Ali M.S., el-Hassan A.M., el-Toum I.A., Satti M., Ghalib H.W., Kager P.A.. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1992, 86: 505-507.
5. Burns J.M., Shreffler W.G., Benson D.R., Ghalib H.W., Badaro R. and Reed S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of Leishmania chagasi that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993, 90: 775-779.
6. Kumar R., Pai K., Pathak¸K. and Sundar S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Recombinant K39 Antigen in Diagnosis and Prognosis of Indian Visceral Leishmaniasis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2001, 8: 1220-1224.
7. Ajay B., Nada S. D., Shyian J., Roberto B., Reed S. G., Yasir A., Skeiky W. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of Leishmania chagasi. Molecular and Biochemical Parasitology, 1999, 102: 249-261.
8. Rosario E. Y., Genario O., Franca-Silva J. C., Da Costa R.T., Mayrink W., Carneiro M. Evaluation of

enzyme-linked immunosorbent assay using crude crude Leishmania and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2005, 100: 197-203.
9. Rosati S., Ortoffi M., Profiti M., Mannelli A., Mignone W., Bollo E. and Gradoni L. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant Leishmania antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2003, 10: 1153-6.
10. Farajnia S., Alimohammadian M.H., Reiner N.E., Karimi M., Ajdari S., Mahboudi F. Molecular characterization of a novel amastigote stage specific Class I nuclease from Leishmania major, International Journal for Parasitology, 2004, 34: 899-908.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 1970, 227: 680-5.
12. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, 76: 4350-4.
13. Ghose A.C., Halder J. P., Pal S.C., Mishra B.P. and Mishra K. K. Serological investigation on Indian kala-azar, Clinical and Experimental Immunology, 1980, 40: 318-326.
14. Maalej I.A., Chenik M., Louzir H., Salah A.B., Bahloul C., Amri F. and Dellagi K. Comparative evaluation of ELISA's based on ten recombinant or purified Leishmania antigens for the serodiagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2003, 68: 312-320.
15. Martin S.K., Thuita-Harun I., Adoyo-Adoyo M. and Wasunna K.M.A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis, based on antigen from media conditioned by Leishmania donovani promastigotes, Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 1998, 92: 571-577.
16. Kubar J., Fragaki K. Recombinant DNA-derived Leishmania proteins: from the laboratory to the field, The Lancet Infectious Diseases, 2005, 5: 107-14.