

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

احسان احمدپور<sup>۱</sup>شهاب‌الدین سروی<sup>۲</sup>احمد دریانی<sup>۳</sup>مهدی شریف<sup>۳</sup>محمد باقر هاشمی<sup>۴</sup>آزاده میزانی<sup>۱</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** بیماری توکسوپلاسموز از بیماری‌های شایع در جهان می‌باشد که حدود یک سوم مردم دارای آنتی‌بادی بر علیه توکسوپلازما هستند. این بیماری بیشتر به دلیل عوارض وخیم آن، در موارد مادرزادی و نیز بیماران نقص سیستم ایمنی اهمیت دارد. ژن کد کننده پروتئین 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 توکسوپلازما گوندی بود.

**مواد و روش‌ها:** در مرحله اول پس از جداسازی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما از مایع صفاقی موش آلوده، DNA آن استخراج شد و پس از انجام PCR (Polymerase chain reaction)، محصول تکثیر شده بر روی ژل الکتروفورز بررسی گردید. سپس ژن حاصل در وکتور pTG19-T کلون گردید. جهت تأیید از روش‌های Colony-PCR و هضم آنزیمی به وسیله آنزیم‌های محدود کننده HindIII و EcoRI استفاده شد. در نهایت ژن 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 موفقیت آمیزی در پلاسمید pTG19-T کلون شد و این پلاسمید می‌تواند برای مطالعات بعدی جهت ساخت واکسن DNA و طراحی کیت تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** توکسوپلازما گوندی، GRA۱۴، کلونینگ

## مقدمه

اغلب بدون علامت است؛ اما در نوزادان و افراد مبتلا به نقص اکتسابی سیستم ایمنی، عوارض شدیدتری 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).

توکسوپلازما گوندی یک تک‌یاخته 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

E-mail: shahabesarvi@yahoo.com

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

۱. دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، 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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۱۲/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۲/۱۰

GRA ۱۴ 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 توکسوپلازما 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 GRA ۱۴ در دنیا انجام نشده است، هدف از این پژوهش، شناسایی و کلون کردن ژن کد کننده این پروتئین در سویه RH توکسوپلازما گوندی برای اولین بار در ایران بود. نتایج حاصل از این مطالعه 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 تاکای زوئیت‌های سوش استاندارد RH توکسوپلازما گوندی نگهداری شده در دانشکده پزشکی ساری استفاده گردید. به منظور تکثیر انگل، ابتدا به هر موش سوری سفید تعداد  $10^6 \times 5-8$  تاکای زوئیت 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 تاکای زوئیت‌ها در ۸۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید (۸، ۳).

در حال حاضر، بررسی‌ها به سمت شناخت آنتی ژن‌های ایمونژن و محافظت کننده توکسوپلازما گوندی سوق یافته است؛ زیرا با تشخیص این آنتی ژن‌ها می‌توان با تولید پپتیدهای مصنوعی و تولید منوکلونال آنتی‌بادی محافظت ایجاد کرد. آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشچی تاکای زوئیت توکسوپلازما، به شدت ایمونژن هستند و بررسی‌های مختلف در مدل موشی نشان داده است که شیوه تهیه آنتی ژن دفعی- ترشچی، 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 تأثیر گذار می‌باشند (۸، ۶).

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

پروتئین‌های گرانولی متراکم در حین یا بعد از تهاجم انگل توکسوپلازما گوندی 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 تاکای زوئیت‌های 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 توکسوپلازما گوندی، GRA ۱۴ 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 توکسوپلازما گوندی است و در نشخوار کنندگان باعث سقط جنین می‌گردد، پروتئین‌های گرانولی متراکمی به نام

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

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

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 ۱۰۰ bp الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز و مشاهده قطعه ژنی GRA14، طبق پروتکل کیت استخراج از ژل شرکت بیونر کره Bioneer, AccuPrep® Gel Purification Kit, (۳۰۳۵-۱) (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 GRA14 در پلاسمید pTG19-T و انتقال آن به باکتری مستعد Ecoli سوش Top10 در این مطالعه به منظور انجام کلونینگ از کیت PCR-T- cloning vector شرکت Vivantis استفاده شد. جهت انجام این کار در یک میکروتیوپ ۰/۵ 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.

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

ماده	مقدار
PCR product	۵ μl
Vector	۳ μl
۵x Ligation buffer	۶ μl
T4 DNA Ligase	۱ μl
Nuclease-free water	۱۵ μl
Total	۳۰ μl

استخراج DNA تاکی‌زوئیت‌ها بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA (Bioneer, AccuPrep® -۳۰۳۲) انجام شد. غلظت و کیفیت DNA به دست آمده با دو روش جذب نوری و الکتروفورز بررسی شد.

#### طراحی پرایمرها

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

تکثیر و جداسازی ژن GRA14 توکسوپلاسما گوندیدی با روش PCR

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از PCR master mix های شرکت Bioneer کره (Cat No:K-۲۰۱۲) استفاده شد و تکثیر ژن GRA14 در ۳۵ سیکل طبق برنامه به شرح زیر انجام شد: مرحله واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ 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

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

۴- تعیین توالی ژن GRA ۱۴ کلون شده:

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

## یافته‌ها

در مرحله اول، کار استخراج DNA انجام شد و جهت تأیید، محصول استخراج روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. غلظت نمونه نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ در حدود ۱۵۱ نانوگرم در میکرولیتر برآورد شد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از DNA ژنومی با پرایمرهای طراحی شده برای ژن GRA ۱۴ توکسوپلازما،

پس از انجام واکنش فوق جهت پذیرش (Transformation) پلاسمید حاوی ژن GRA ۱۴، از باکتری Ecoli (Escherichia coli) سوش Top ۱۰ 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 گردید و در نهایت با استفاده از شوک حرارتی پلاسمید نوترکیب به داخل باکتری منتقل شد.

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

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

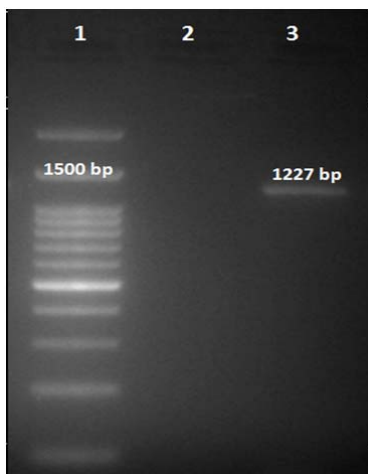
۱- تشکیل کلونی‌های آبی و سفید:

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

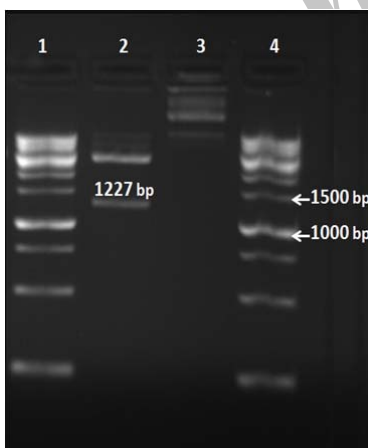
۲- انجام Colony PCR از کلنی‌های آبی و سفید:

برای این کار ۲-۳ عدد از کلنی‌های آبی و سفید حاصل مرحله ترانسفورم انتخاب (به عنوان جایگزین DNA الگو) و با استفاده از PCR Master Mix های شرکت Bioneer واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد و سپس محصول به دست آمده در ژل ۱ درصد آگارز الکتروفورز گردید تا وجود قطعه کلون شده مورد نظر تأیید گردد.

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 توکسوپلازما گوندیی ثبت شده در بانک جهانی ژن، ۱۰۰ درصد همخوانی دارد (تصویر شماره ۴).

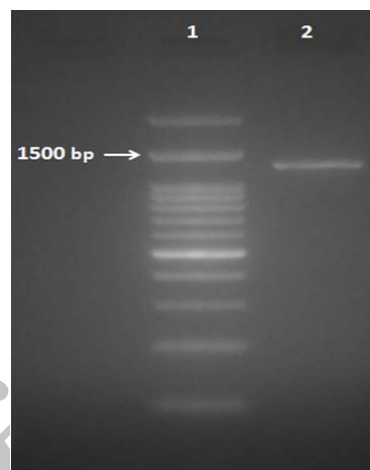


تصویر شماره ۲: الکتروفورز محصول کلونی PCR از کلونی‌های سفید و آبی بر روی ژل آگارز ۱ درصد (ستون ۱: نشانگر با وزن ملکولی ۱۰۰ bp، ستون ۲: محصول PCR از کلونی آبی فاقد ژن GRA۱۴، ستون ۳: محصول PCR از کلونی سفید حاوی قطعه ژنی ۱۲۲۷ جفت بازی ژن GRA۱۴)  
PCR: Polymerase chain reaction  
GRA۱۴: Dense Granule Antigen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



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

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

پس از انتقال ژن GRA۱۴ توسط پلاسمید pTG۱۹-T به داخل باکتری Ecoli سویه Top1۰ به عنوان میزبان و کشت آن بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG، کلونی‌های سفید و آبی تشکیل شد که نشان دهنده انتقال پلاسمید به درون باکتری مورد نظر بود. همچنین جهت تأیید وجود ژن نو ترکیب در پلاسمید pTG۱۹-T از کلونی‌های سفید طبق پروتکل دمایی و زمانی پیش گفته برای PCR اولیه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد و با الکتروفورز محصول واکنش وجود ژن GRA۱۴ تأیید گردید (تصویر شماره ۲).

در ادامه پس از تأیید کلون نو ترکیب با PCR، جهت تأیید با روش هضم آنزیمی، کلونی‌های حاوی ژن کشت داده شد و پلاسمید استخراج گردید و در نهایت، در معرض آنزیم‌های محدودالانتر EcoRI و HindIII قرار گرفت که در الگوی الکتروفورزی آن دو باند که یکی مربوط به پلاسمید و دیگری

ATGCAGGCGATAGCGCGGGGGACCGCTCGTCGGGGTGGTTCGAGTTGTAGCTGGCTTTTCTATTTTTCTGTTTCTGCTT  
 CTAACGAGTGAAGCAGTGGCTGCAGCTGCCAGTTTGGAGCAGACAATTCCTATTCTGTCCAACATCAACCGCAGCAG  
 GAAGGCATCCTCGGCACACAGAAACCCAGACTGCCCAACTCCTCAGCAGCTCATTGTGCCCGTAAGCTATCTAGGA  
 GATGGTTTTGTCACTTCTCTGGAGTTCTTAGGCGTTTACCCCTCGATGTTGCATTGGAACGTTTAACTAGTGCTCGG  
 GAAATACCAACTGTGGCAGGTTTTGTCAAAAATATGTGCTGGCGGCCAGCTATCTCGATCCCTTCAGAGCACGGCG  
 AACGGCGTGAAGAAGATTCTAATGCGTCTCGATGCAGCCAAAAATGAAGAAGGATTTATAACAGATCTGTTGAAGTCC  
 GCTCCTGAGGTTCAAGAAGTTCTGAGCCGTTTCTTGGTTCGTTGCGTCTGCACTTGTCTTTTGGACATCAATGGT  
 CTCCATGAGGCGGTTGACGCTAGTCTCCCGTGACAAAAGCAGTGGTCATGCTGTACTTACATCTAGTGAGTGTCTGTA  
 CCGCCGAAACAACGGGATCCTTTCTCTCTTTCTTTATCTGCAAGATGCCGTGGGAGAGTTCAAGATCATGGAG  
 GACCATGTCGCTCTGTTGTTGCTGGTGAGGCACAGGAGGAAAATGTTATAAACAGTCAACCACAGGGAACCGGAAACG  
 TCGCACAGGGCGGTAGTGAGAGGGGGCATAAGAATGCTACAATCTGGGACCTCCGAAACCACGAAGCTGCGGAGGACG  
 TGGTGGAGTTATTTAAAGTGGCTGCTCTCGCCGCTTAAACGATGGCAGTGAATATGTTACGCTCGTGTGTCGCGC  
 GCTTTTCTCGAGAGAAGCGGATGCGCCGAGACGGAGGTGGGGACAGTGGAGACTTTGGAGAAGGGGGCGCTCAAAA  
 GGAGACGTGCAACTTCTGATGATATGCCAGAGAGCCGCCCGCCGCTACTCTCCGCCATGTATCCGTTTCGCCGAT  
 CCTGAACACAGATGGGCTGGTACGTACGGAACGTCTCATGGAGTTATCGAGTACAACCGACAGCTCCACCCGCCCT  
 GCGTCTATGCTATATCCGAGTTTACACAGGCTGGGCTACCAGAGACCAAGCGAATAG

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

GRA۱۴: Dense Granule Antigen 14

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

کواکب و همکاران، پروتئین P۳۵ انگل توکسوپلازما گوندی را در وکتور pGEM-T کلون نمودند و برای ترانسفورماسیون از سویه LB۲۱ با کتری اشرشیا کلی استفاده نمودند. در این مطالعه، توالی ژن مورد نظر با توالی موجود در بانک جهانی ژن همخوانی ۱۰۰ درصدی را نشان داد (۱۴). بابایی و همکاران، ژن بیان کننده GRA۸ توکسوپلازما گوندی را در پلاسمید pET-۲lb(+) کلون نمودند و سپس در باکتری Ecoli سویه DH۵α ترانسفورم کردند. توالی این ژن نیز با توالی ژن بانک همخوانی کامل داشت (۱۵).

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

## بحث

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

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

برخی از این نظر با مطالعه حاضر دارای تفاوت‌هایی می‌باشند. در این مطالعه از پلاسمید pTG19-T و باکتری Ecoli سویه Top10 استفاده شد و نشان داد که جهت انجام کلون ژن GRA14، پلاسمید و باکتری پیش‌گفته مناسب می‌باشد. با توجه به این که کلون کردن و شناسایی ژن GRA14 در وکتور pTG19-T، گام نخست در جهت کلونینگ این ژن در وکتور بیانی و دستیابی به آنتی ژن نو ترکیب GRA14 می‌باشد، بنابراین استفاده از آن در فرایند تولید کیت‌های تشخیصی و DNA واکسن جهت شناسایی و پیشگیری از ابتلا به عفونت توکسوپلاسموز به ویژه در زنان باردار و افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی از جمله مبتلایان به HIV/AIDS (Human immunodeficiency virus infection/acquired immunodeficiency syndrome) می‌تواند مفید واقع شود.

### سپاسگزاری

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

### References

- Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol* 2009; 39(8): 895-901.
- Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis* 2012; 44(11): 805-14.
- Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma Gondii: The Model Apicomplexan. Perspectives and Methods*. Waltham, MA: Academic Press; 2011.
- Zhang M, Joyce BR, Sullivan WJ, Nussenzweig V. Translational control in Plasmodium and toxoplasma parasites. *Eukaryot Cell* 2013; 12(2): 161-7.
- Kaye A. Toxoplasmosis: diagnosis, treatment, and prevention in congenitally exposed infants. *J Pediatr Health Care* 2011; 25(6): 355-64.
- Kur J, Holec-Gasior L, Hisczynska-Sawicka E. Current status of toxoplasmosis vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8(6): 791-808.
- Montoya JG, Remington JS. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Infect Dis* 2008; 47(4): 554-66.
- 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.
- Cesbron-Delauw MF. Dense-granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. *Parasitol Today* 1994; 10(8): 293-6.
- Mercier C, Adjogble KD, Daubener W, Delauw MF. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int J Parasitol* 2005; 35(8): 829-49.

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

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

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

Archive of SID



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

Ehsan Ahmadpour<sup>1</sup>,  
Shahabeddin Sarvi<sup>2</sup>,  
Ahmad Daryani<sup>3</sup>,  
Mehdi Sharif<sup>3</sup>,  
Mohammad-Bagher Hashemi Soteh<sup>4</sup>,  
Azadeh Mizani<sup>1</sup>

<sup>1</sup> PhD Student, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> PhD, Assistant Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> PhD, Professor, Parasitology and Mycology Department, Sari Medical School, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> PhD, Associate Professor, Cellular and Molecular 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