Archi

ORIGINAL ARTICLE

Cloning and Expression of Toxoplasma gondii Rhoptry13 Gene in pcDNA3 Plasmid

Paria Alizadeh[1],
Ahamd Daryani[2],
Ehsan Ahmadpour[3],
Tohid Kazemi[4],
Adel Spotin[3],
Mahmoud Mahami-Oskoui[5]
Yaghob Azadi[1],
Saba Rajabi[1],
Dariush Shanehbandi[6]

[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)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:13 +0430 on Monday May 20th 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, therefor, 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)

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۹ بهمن سال ۱۳۹۷ (۳۵-۲۶)

کلونینگ و بیان ژن کد کننده راپتری سیزده (ROP13) سویه RH توکسوپلاسما 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]

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:13 +0430 on Monday May 20th 2019

چکیده

سابقه و هدف: توکسوپلاسما گوندیی انگل تک یاخته درون سلولی اجباری می‌باشد. 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 کدکننده پروتئین ROP13 سویه RH انگل توکسوپلاسما گوندیی و بیان آن در سلول یوکاریوتیک CHO بود.

مواد و روش‌ها: 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 نوترکیب از روش IFA استفاده شد.

یافته‌ها: با استفاده از روش های PCR، تعیین توالی و روش هضم آنزیمی، کلونینگ ژن ROP13 در پلاسمیدهای بیانی و انتقالی تایید شد. نتایج تعیین توالی ژن کدکننده 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 تایید 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 نوترکیب می توان در مطالعات آتی به منظور واکسیناسیون و تشخیص عفونت می توان بهره برد.

واژه های کلیدی: توکسوپلاسموزیس، Rhoptry 13، pcDNA3، بیان سلولی

مقدمه

توکسوپلاسما گوندیی تک یاخته‌ای با انتشار جهانی است که بسیاری از موجودات خونگرم از جمله حیوانات خانگی، دام‌ها، پرندگان و انسان را آلوده می‌کند(۲،۱). توکسوپلاسموزیس در افراد سالم و دارای سیستم ایمنی

مولف مسئول: احسان احمدپور– تبریز: آبرسان، گلگشت، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی E-mail: Ehsanahmadpour@gmail.com
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

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:13 +0430 on Monday May 20th 2019

نرمال عمدتاً فاقد علایم کلینیکی می‌باشد ولی در افراد با اختلال ایمنی (Immunocopromised) به خصوص در مبتلایان به نقص سیستم ایمنی، به‌عنوان یک عفونت فرصت‌طلب بوده و بیماری وخیم و کشنده ایجاد می‌کند(۴،۳). در خانم‌های باردار نیز می‌تواند منجر به بروز عوارض شدید چشمی یا عصبی و حتی سقط جنین شود(۵). اثرات سمی ناشی از داروهای ضدتوکسوپلاسمایی موجود، ضرورت پیدایش داروهای جدید جایگزین و یا یک واکسن موثر را ضروری می‌نماید(۶). در سال‌های اخیر پیشرفت‌هایی در زمینه شناسایی کاندیدهای واکسن که القاکننده پاسخ‌های حفاظتی مناسب در بدن بوده‌اند، 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 آنتی‌ژن‌های متعدد توکسوپلاسما گوندیی، بیش‌ترین مطالعات بر روی آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی و آنتی‌ژن‌های سطحی تاکی زوئیت انجام شده است(۱۰). آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی در پاتوژنز، مصونیت و فرار انگل از سیستم ایمنی و هم‌چنین در تحریک پاسخ‌های ایمنی نقش دارند(۱۱). با توجه به نقش کلیدی و بیولوژیکی راپتری‌ها در تهاجم و بقاء انگل، این آنتی‌ژن‌ها به عنوان کاندید واکسن مورد مطالعه قرار گرفته‌اند(۱۲). پروتئین راپتری ۱۳ یکی از جدیدترین پروتئین‌های شناخته شده‌ی توکسوپلاسما گوندیی می‌باشد که مطالعات اندکی روی آن صورت گرفته است. تاکنون مطالعه‌ای در خصوص کلونینگ و توالی یابی پلاسمید کدکننده‌ی ژن ROP13 توکسوپلاسما گوندیی در ایران صورت نگرفته است، بنابراین هدف از این پژوهش، شناسایی و کلون کردن ژن کدکننده‌ی این پروتئین در سویه RH توکسوپلاسما گوندیی و بیان آن در سلول یوکاریوتیک CHO می‌باشد. نتیجه این مطالعه می‌تواند در تهیه یک واکسن موثر و در نتیجه کاستن از عوارض بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

مواد وروش ها

کشت انگل و استخراج DNA

سویه حاد انگل توکسوپلاسما گوندیی (RH) از مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز دانشگاه علوم پزشکی مازندران تهیه گردید و به منظور پاساژ متوالی، انگل به داخل صفاق به موش‌های نژاد BALB/C تزریق گردید. برای استخراج DNA از تعداد ۵×۱۰^{۶} تاکی زوئیت در حجم ۱۰۰ میکرولیتر استفاده شد(۱۰). استخراج DNA از تاکی زوئیت‌ها با کیت استخراج DNA شرکت بیونیرکره‌جنوبی (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 زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR (Polymerase chain reaction) ابتدا آغازگرهای رفت و برگشت با استفاده از اطلاعات تنها توالی ثبت شده و موجود درسایت 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، توالی‌های حاوی جایگاه‌های 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 توکسوپلاسما گوندیی به همراه توالی های برش آنزیمی (زیر محل اثر آنزیم خط کشیده شده است)

آغازگر رفت(Forward)	GC**GGATCC**ATGAAGAGAACAGAGCTTTG (BamH I)	
آغازگر برگشت(Reverse)	GC**TCTAGA**TCACAATAGCCTCAAGGAATTC (Xba I)	

تکثیر وجداسازی ژن ROP13 توکسوپلاسما گوندیی با روش PCR

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از مسترمیکس PCR شرکت سیناکلون (Cat No: PL5202) و DNA

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:13 +0430 on Monday May 20th 2019

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 (Innitial Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱ دقیقه واسرشتگی (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و ۳۰ ثانیه در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد (Annelling) و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (Extention) و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد 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 و انتقال آن به باکتری مستعد Ecoli 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 *Ecoli* سوش Top10 مستعد شده به روش کلریدکلسیم 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

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

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 ۲دقیقه سانتریفیوژ گردید. از رسوب باقی مانده در سطح پلیت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG اضافه و پخش گردید و به مدت ۱۶-۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد 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 پلیمراز 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.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:13 +0430 on Monday May 20th 2019

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 توکسوپلاسما گوندیی موجود در بانک جهانی ژن مقایسه گردید.

برش آنزیمی پلاسمید pTROP13 و پلاسمید بیانی

به منظور برش آنزیمی به‌صورت Double Digestion از ۲ آنزیم *BamH1* و *Xba1*، هم‌چنین پلاسمید pcDNA3 برای پذیرش قطعه ROP13 و انجام کلونینگ با آنزیم‌های فوق برش داده شد و نتایج برش آنزیمی هرکدام 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 ۲۰میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر پلاسمید pcDNA3 (برش خورده با آنزیم‌های BamH I و Xba I)، 12 میکرولیتر قطعه ROP13 (جداشده از پلاسمید نوترکیب 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 سانتی‌گراد و سپس به طور شبانه در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد 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 آنتی‌بیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از اتمام مدت انکوباسیون، در دور ۷۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد.

غربال کردن پرگنه‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pcROP13

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های ترانسفورم شده به پلیت LB آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین اضافه شد و در سطح محیط LB آگار پخش گردید و overnight در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. باکتری‌های حاوی پلاسمید توانایی رشد روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین را دارند.

روش‌های تایید کننده کلون شدن قطعه ROP13 در پلاسمید بیانی pcROP13

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

بیان پلاسمید نوترکیب 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 آنتی‌بیوتیک پنیسیلین- استرپتومایسین استفاده گردید(۱۴). برای ترانسفکت سلول یوکاریوتیک در این مطالعه از کیت ترانسفکت PolyPlus ساخت کشور فرانسه (Cat No. 114-01) طبق دستور العمل شرکت سازنده استفاده شد. پس از ترانسفکشن، به سلول های یوکاریوتیک ترانسفکت شده ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه کرده و به درون پلیت کشت سلول انتقال داده شد. پلیت حاوی سلول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. پس از ۴۸ ساعت بیان ژن در سلول‌های یوکاریوتیک با

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:13 +0430 on Monday May 20th 2019

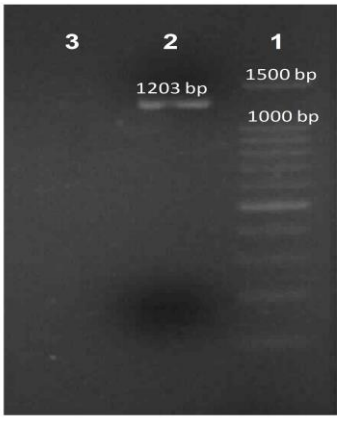
روش IFA (Indirect Immuno fluorescence assay) مورد مطالعه قرار گرفت(۱۲). به طور خلاصه سلول‌ها، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن بر روی لام فیکس شدند. سپس سرم بیماران مبتلا به توکسوپلاسموزیس با تیتر بالای IgG به عنوان آنتی بادی اولیه و آنتی IgG ضد توکسوپلاسموزیس نشاندار شده با ماده فلورسانت (FITC) به عنوان آنتی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

یافته ها

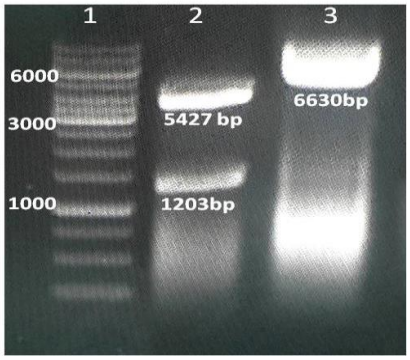
در مرحله اول، استخراج DNA از تاکی زوئیت‌های سویه RH توکسوپلاسما انجام شد و صحت انجام استخراج با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد تایید گردید. پس از آن واکنش زنجیره ای پلیمراز از DNA ژنومی با پرایمرهای طراحی شده برای ژن ROP13 توکسوپلاسماگوندیی انجام شد. محصول واکنش PCR بر روی ژل ۱ درصد آگارز الکتروفورز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

کشت باکتری های ترانسفکت شده با پلاسمیدها بر روی محیط LB آگار حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین، X-gal و IPTG، باعث تشکیل پرگنه های سفید و آبی شد که نشان دهنده انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری (پرگنه‌های سفید) مورد نظر بود. هم‌چنین 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 و مقایسه آن با ژن ثبت شده در NCBI نشان دادکه این توالی باژن ROP13 توکسوپلاسما گوندیی ثبت شده در بانک جهانی ژن، ۱۰۰ درصد همخوانی دارد (تصویر شماره ۳).



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



تصویر شماره ۲: الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمید pcDNA3 حاوی ژن ROP13 انگل توکسوپلاسما گوندیی 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)

www.SID.ir

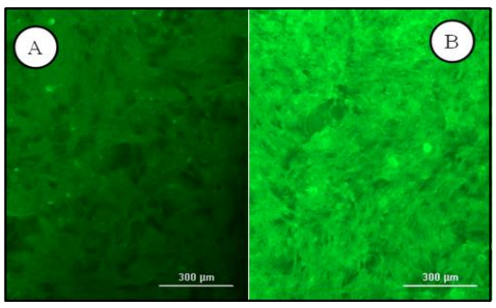
Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:13 +0430 on Monday May 20th 2019

در نهایت بررسی بیان سلول های CHO ترانسفکت شده با پلاسمید pcROP13 با روش IFA انجام شد و نتایج نشان داد که سلول های 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
GCTGTTGGTGCGTTTGCTTTTACCTCACCAAATG
CAGTGGCGAAGAGCTTCGAGCGGAACCTCGGCCACC
TGGACGCCTCCTCGTTCTTGTCGTCTCCCCTCAA
TTCGGATGTGGAGCTCGGTAGGAGCACTTTCCCTGCT
CAGTCACTGTCTTTCACTGAAGGCACCAACGAG
ACAAACCCACCGACATCCCGGCCCCCAGGTTGGAAA
TACGAAGGCAGCGACCTGCATCGAAGAGTGGTGG
CTCGACGGGAGGAACACAAAAAGCGTCAAGAAGAG
TGGGAACAGAGGAAAGCCAGTCGACGCTCTGCACT
CACTCCGAGTGCACCCGATCCCGATGGTGACGGTGA
TCCAGCAACTTCACTTCCATCACAACGGAGACTC
CTTGACCGTTGTCTTCAACAATTCCGTGAACAACTCG
TGGATTTGGAGAATCTCTGCAAGGGCAGCCCGG
AACCTGATGACTGCAGGTCGACGGTCCAAGAAATCC
TGGCGAATCAGTCGTTTGGGGCTCTTCACACAAC
TGTCATAAGTTTCTCCATTTTTGTCAATAGGGACCCT
CGACGGTTGTCATTTCCAGTCCTCGATGCAACA
GATTTGCGCCTCACGGTCAAGCTCAAACATCTCCTGG
ATAGAATTCCGGGATGCGCAGCTCTCTCCCTGC
CAGTATACATTGGGTTGGTCTCTTCGGATGTGTTCAA
GAGCGAAGAATTCACTAGAAAGGTAAATCGATG
CTCGGAGGATTTCGGCAGGAGCGCCAGAGAGGAGCC
AAGCAAAGCTGGGAGGGCGGCTGCGGCTGTCATT
CGATTCATGGGACTTACGCCGGAGAGACAAACGTTC
TACCAACCTTTCGTGTTCGTCACAACCCAGGCAG
CAATGCTGCTGTCGATGGTTTTGAAACATCCGTTTCT
CTCGATACTCGTAAACATGGCCTGTGTAGCGGG
CAGCCTTTGCCGCAAGGGAATTCGAGAGGTACTCTTG
CGAGCTCTTCGGGAGGCAGACTTCCAGACGGAG
GGTGTGCCACTGGACTCCGCACCTCAGGAACTTGTGG
ACCATCTCAAAGTGTACTTGAAACTACTTTTCT
TAAGGAAATACCGCAGGTTGAGGAGGCAAGCCGCTA
ATGTTGCTGCCCAAGTTGTCTATGCGAATTCCTT
GAGGCTATTGTGA

تصویر شماره ۳: توالی DNA ژن کدکننده پروتیین ROP13 در سویه RH توکسوپلاسما



تصویر شماره ۴: بررسی بیان ژن کد کننده ژن ROP13 توکسوپلاسما گوندیی در سلول‌های CHO با استفاده از روش ایمنوفلورسانس آنتی بادی (A: سلول‌های CHO ترانسفکت شده با پلاسمید خالی pcDNA3، B: سلول های CHO ترانسفکت شده با پلاسمید pcROP13)

بحث

در این مطالعه ژن ROP13 توکسوپلاسما 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 قرارگرفت. به‌دلیل اهمیت بیماری توکسوپلاسموزیس در افراد مبتلا نقص سیستم ایمنی و زنان باردار و هم‌چنین زیان های فراوان اقتصادی و اجتماعی ناشی از آن، پیشگیری از بروز بیماری و هم‌چنین تشخیص و درمان به موقع ضروری می‌باشد(۵،۴). لذا دست یابی 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(۱۴،۹). آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی انگل توکسوپلاسما گوندیی که باعث ایجاد ایمنی حفاظتی موثر علیه انگل می‌شوند، شامل مواد مترشحه از ارگانل‌های میکرونم، 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 آن ها انجام شده است. از این رو آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی به عنوان کاندیدهای مناسب برای بررسی‌های ایمونیزاسیون و حتی تشخیص عفونت توکسوپلاسما 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 توکسوپلاسما گوندیی به صورت پلاسمید و یا پروتئین نوترکیب انجام شده است. با وجود این تاکنون مطالعه‌ای در زمینه کلون و بیان ژن ROP13 انگل توکسوپلاسماگوندیی در ایران صورت نگرفته است. این مطالعه نیز همانند مطالعات قبلی، اولین قدم برای مطالعات بعدی جهت تولید پروتئین‌های نوترکیب

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:13 +0430 on Monday May 20th 2019

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 نوترکیب درتشخیص و درمان و هم‌چنین طراحی و ساخت کیت‌های تشخیصی برای شناسایی عفونت و حتی افتراق عفونت حاد و مزمن دارای اهمیت می‌باشد(۱۴،۹).

دلیمی وهمکاران،ROP1 انگل توکسوپلاسماگوندیی را در وکتور PTZ57R/T کلون نمودند و برای ترانسفورماسیون از باکتری *E.coli* سویه TG1 استفاده نمودند. در این مطالعه، توالی ژن موردنظر با توالی موجود دربانک جهانی ژن، همخوانی۹۶ درصدی را نشان داد(۱۸).

در مطالعه Pei-Yuan Wang و همکاران در ارتباط با کلون کردن ژن ROP13 انگل توکسوپلاسماگوندیی از وکتور Pvax جهت کلونینگ استفاده شده است(۱۲). در مطالعه حاضر، با تعیین توالی ژن ROP13 توکسوپلاسماگوندیی کلون شده در پلاسمید pTG19-t 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 توکسوپلاسماگوندیی بوده و درحقیقت 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 پلاسمیدpcDNA3 به ترتیب به عنوان وکتورهای انتقالی و بیانی برای اولین بار برای کلون کردن ژن ROP13 مناسب هستند. هم چنین 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 توکسوپلاسما گوندیی مورد استفاده قرار گرفته است. نتایج این مطالعه نیز مناسب بودن این وکتورها را برای استفاده در کلونینگ نشان داد(۹). با توجه به این‌که کلون کردن و شناسایی ژن ROP13 در وکتورهای بیانی و انتقالی ذکر شده و رسیدن به آنتی‌ژن نوترکیب 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 نوترکیب 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 انگل‌شناسی پزشکی می‌باشد که هزینه آن توسط مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز طی طرح مصوب به شماره ۴۳۷۷۷/د/۵ با کد اخلاق IR.TBZMED.REC.1395.578 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

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:13 +0430 on Monday May 20th 2019

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-Chioccola 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

www.SID.ir

Archive of SID

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).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 11:13 +0430 on Monday May 20th 2019

www.SID.ir