کلونینگ ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندای سویه RH در پلاسمید یوکاریوت بیانی pcDNA3 و بیان آن در سلول CHO

راضی ناصری فر[۱]، فاطمه غفاری فر[۱*]، عبدالحسین دلیمی‌اصل[۱]، زهره شریفی[۲]

۱) گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

۲) گروه ویروس‌شناسی، سازمان انتقال خون

تاریخ دریافت:۹۰/۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۷

چکیده

مقدمه: توکسوپلاسموز یکی از بیماری های زئونوز و دارای انتشار وسیع در جهان بوده که اثرات شدید بـالینی و دام پزشکی عدیده ای را ایجاد می‌کند. این انگل داخل سلولی باعث عوارض عصبی و بیماری های چشمی در افراد دارای ضعف ایمنی و نوزادان متولد از مادران آلوده می شود. بروز موارد زیاد بیماری همراه با عوارض شدید و کشنده توکسوپلاسموز ضرورت یافتن واکسن مؤثری برای این بیماری را نشان می دهد. یکی از مهم ترین راه های کنترل بیماری واکسیناسیون است که تاکنون واکسنی مؤثر علیه این انگل پیدا نشده است. با عنایت به زئونوز بودن بیماری در جهان، یکی از مهم ترین راه های آلودگی انسان مصرف گوشت های خام یا نیم پز حاوی انگل است. بر همین اساس، استفاده از واکسن مناسب حیوانی نیز می‌تواند باعث تحریک ایمنی حیوان شده و از آن در مقابل تولید کیست در بدن محافظت نماید. با توجه به شیوع وسیع این انگل داخل سلولی در انسان و حیوانات و اثرات شدید و کشنده آن، تولید واکسن های جدید بر علیه این بیماری ضرورت می‌یابد. ایمن سازی با پلاسمید حاوی ژن های کدکننده پروتئین های محافظت کننده، به عنوان روشی نسبتاً ابداعی و راهکاری امید بخش از تکنیک‌های ساخت واکسن به شمار می‌آید. به همین دلیل پلاسمید کدکننده ژن GRA5 را تهیه تا بتوان از آن برای ساخت واکسن بر علیه این عفونت استفاده نمود.

مواد و روش ها: در این تحقیق، ژن GRA5 با استفاده از روش PCR در پلاسمید انتقالی pTZ57R کلون و پس از آن در باکتری اشرشیاکلی سوش TOP10 ترانسفورم شد. سپس پلاسمید نوترکیب از باکتری میزبان استخراج و ژن هدف با استفاده از آنزیم های Hind3 و EcoRI از پلاسمید pTZ57R جدا گردید. در مرحله بعد پلاسمید pcDNA3 برای پذیرش قطعه GRA5 و انجام کلونینگ نیز با آنزیم های Hind3 و EcoRI برش داده شد و ژن GRA5 درون پلاسمید pcDNA3 ساب کلون شد. محصول واکنش اتصال در باکتری فوق ترانسفورم و در محیط LB حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد. پلاسمیدهای نوترکیب pcGRA5 با استفاده از کیت استخراج پلاسمید، از باکتری تخلیص و در مرحله بعد در سلول یوکاریوتی CHO ترانس فکت گردید و در خاتمه بیان پلاسمید نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت.

یافته های پژوهش: به منظور تایید مراحل مختلف کار از روش های PCR و برش آنزیمی استفاده شد. پس از الکتروفورز مشخص شد که قطعه GRA5 در پلاسمید pcDNA3 کلون شده است. قطعه مورد نظر بر روی ژل الکتروفورز در حدود 363 bp بود که هم‌اندازه ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندای است. به منظور تأیید نهایی، قطعه مورد نظر از تعیین توالی استفاده و با قطعه استاندارد ثبت شده در بانک ژن مقایسه گردید. برای تایید بیان ژن مورد نظر در سلول CHO از روش وسترن بلات استفاده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که کلونینگ و ترانسفورم قطعه GRA5 در پلاسمید pcDNA3 با موفقیت انجام شده و با استفاده از روش وسترن بلات بیان پروتئین ۱۳ کیلو دالتونی تایید گردید.

واژه های کلیدی: توکسوپلاسما گوندای، کلونینگ، GRA5، pcDNA3، بیان سلولی، وسترن بلات

***نویسنده مسئول:** گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

Email: ghafarif@modares.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

توکسوپلاسموزیس توسط تک یاخته‌ای انگلی به نام توکسوپلاسما گوندای(Toxoplasma gondii) ایجاد شده که گسترش جهانی دارد،(۹). این بیماری به علت عفونت مادرزادی و سقط جنین در انسان و حیوانات اهلی دارای اهمیت پزشکی و دام پزشکی است،(۹). توکسوپلاسموزیس اثرات متفاوتی در میزبان ایجاد می‌کند. در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی مثل افراد مبتلا به ایدز، گیرنده های پیوند عضو و بیماران سرطانی باعث بیماری های شدید و مرگ و میر می‌شود،(۱۰). این بیماری با کوریورتینیت، کوری، تورم غدد لنفاوی، آنسفالیت و یا مرگ همراه است،(۱۱). توکسوپلاسموزیس مادرزادی، که حاصل عبور انگل از جفت در هنگام آلودگی اولیه مادری است، می‌تواند باعث سقط جنین، مرگ جنین در رحم یا نقص های شدید مادرزادی نظیر هیدروسفالی، و عقب‌ماندگی ذهنی یا کوریورتینیت گردد.(۱۲)

توکسوپلاسموز نوعی بیماری زئونوز بوده و داشتن واکسنی مؤثر می‌تواند اثرات مفیدی از نظر پزشکی و دام پزشکی در پی داشته باشد. واکسن مؤثر انسانی بایستی در مرحله اول علاوه بر کاهش موارد ابتلا و مرگ ناشی از بیماری بتواند نسبت به کاهش بار بیماری در موارد مزمن بیماری که نیاز به مراقبت طولانی دارند تأثیرگذار بوده و از نظر اقتصادی نیز به صرفه باشد. واکسن ایده‌ال حیوانی دارای منافع متعددی از جمله افزایش قدرت تولید مثل و کاهش خطرات بهداشتی برای مصرف کنندگان گوشت های مشکوک می باشد. برای مدت ۵۰ سال، انتی ژن های خام به عنوان واکسن بر علیه توکسوپلاسموز مورد آزمایش قرار گرفته اند که مطالعات روی کارایی زیر واحدهای خالص یا ترکیبی جدید حدود ۱۰ تا ۲۰ سال سابقه دارد. واکسن‌های sub-unit دارای این امتیاز هستند که با حضور آنتی ژن های ایمنوژنیک و بدون اضافه نمودن آنتی ژن های غیر مرتبط ایجادکننده پاسخ های تب‌زا همراه با پاسخ ایمنی، باعث تحریک سیستم ایمنی می شوند. آنتی ژن های دارای پاسخ های محدود ایمنی را می توان با مواد غیر طبیعی تقویت نمود. این اجزاء به صورت ادجونت‌های(یاور) مناسب بوده و باعث ارتقای کارایی واکسن می‌شود.

معمولاً (SAG1) آنتی‌ژن های سطحی تاکی زوئیت به عنوان معمول ترین Ag مورد بررسی هستند که به صورت آنتی ژن نوترکیب استفاده شده اند است. کاندیدهای جدید برای ساخت واکسن آنتی ژن های ROP1، ROP2، GRA1، GRA2، GRA4، GRA5، HSP70، SAG2، SAG3، SRS1، P54، P24 می باشند. گروه آنتی ژن های ترشحی یا GRA جزعی از ژن های هسته ای بوده و توسط DNA هسته ای کد می شوند. از بین آن ها GRA5 به عنوان یکی از آنتی ژن های مهم توکسوپلاسما در مراحل مختلف سیکل زندگی انگل ترشح می شود. لازم به ذکر است که این ژن در تست تشخیصی الیزا نیز کاربرد فراوانی دارد و چنانچه با تهیه ژن کامل و استفاده از اجودنت های مختلف، خاصیت ایمنی زایی آن بررسی شود، می توان به تهیه واکسنی موثر بر علیه توکسو پلاسموز امیدوار بود.(۱۳)

هدف از این مطالعه، کلون کردن قطعه GRA5 در پلاسمیدیوکاریوت بیانی pcDNA3 و ترانسفورم این پلاسمید نوترکیب در باکتری Ecoli سوش TOP10 بوده است. GRA5 از برادی زوئیت ها و تاکی زوئیت ها ترشح می‌شوند. جهت بیان ژن GRA5 در سلول یوکاریوت و استفاده آن در تهیه واکسن، کلون نمودن ژن GRA5 در یک پلاسمیدیوکاریوتی اهمیت دارد. به این دلیل، در این مطالعه از پلاسمید pcDNA3 استفاده و در نهایت به منظور تایید بیان سلولی از سلول های CHO استفاده و با روش SDS-page تایید شد.

مواد و روش ها

تکثیر انگل توکسوپلاسما: تاکی زوئیت های تازه و فعال انگل توکسوپلاسما گوندای(۲×۱۰۴) را به صورت داخل صفاقی به موش سوری تزریق نموده و بعد از گذشت ۵-۴ روز موش ها را کشته و با تزریق مقداری PBS استریل حاوی استرپتومایسین-پنی‌سیلین به داخل صفاق، انگل تکثیر یافته را به داخل سرنگ می کشیم.(۱۴،۱۵)

Archive of SID

www.SID.ir

استخراج DNA (DNA Extraction): جهت استخراج از کیت استخراج DNA شرکت(Bioneer) استفاده شد. دستورالعمل کیت به طور خلاصه بدین ترتیب می باشد: ۱۰۰ میکرولیتر(در حدود ۵×۱۰۷) از سلول های جدا شده در بافر PBS را درون یک ویال ۱/۵cc ریخته و ۲۰۰ میکرولیتر از بافر TL و ۲۰ میکرولیتر از پروتئیناز k موجود در کیت را به آن اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت در ۶۰ درجه سانتیگراد انکوبه می شـــود. محصول لیز شده را به طور کامل به ستون های موجود در کیت منتقل نموده و در دور rpm ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ و به دنبال آن ستون را به یک تیوب ۱/۵ سی سی منتقل نموده و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول EL را به ستون اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در حرارت انکوبه نموده و در دور ۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ نموده و محصول در ۲۰- نگهداری می گردد.

طراحی پرایمره: براساس توالی استاندارد ژن کدکننده آنتی‌ژن کـــامل GRA5 با شماره دستیابی EU918733.1 پرایمرهای اختصا صی طراحی گردید.

Forward: (aagcttatggcgtctgtaaaacgcg)
Reverse: (gaattcttactcttcctcggcaacttc)

پرایمر Forward دارای جایگاه برش آنزیمی Hind3 و کدون شروع(ATG) و پرایمر Reverse دارای جایگاه برش آنـــزیمی EcoRI و کـــدون توقف(TAA) است. قطـــعه تکثیـــر یافته توسط پرایمرهای فوق حدود bp ۳۶۳ می باشد.

تکثیر ژن GRA5 با روشPCR: بـــرای انجام این مـــرحله، DNA استخـــراج شـــده از تـاکی زوئیت های توکسوپلاسما گوندای به عنوان الـــگو استفـــاده گـــردید و واکنشـــی به حجم ۲۵ میکرولیتـــر تهـــیه شد. ترکیبات و بـــرنامه استفـــاده شـــده در جدول های زیر آمده است.

نوع ماده	مقدار بر حسب میکرولیتر (µl)
mamix ster	12 µl
Primer forward	(10 pmol / µl) 1µl
Primer reverse	(10 pmol / µl) 1µl
Template DNA	3 µl
ddH2o	18 µl

مرحله	درجه حرارت (سانتی گراد)	مدت
Initial Denaturation	۹۴°C	۵ دقیقه
	۳۰ سیکل	
Denaturation	۹۴°C	۴۰ ثانیه
Annealing	۵۹°C	۳۰ ثانیه
Extension	۷۲°C	۴۵ ثانیه
Final Extension	۷۲°C	۷ دقیقه

کلونینگ ژنGRA5 در پلاسمید pTZ57R: با استـــفاده از کیـــت کلونیـــنگ T/A(Cloning Kit) شرکتFermentas (#k1213) و دستورالعمل آن، ژن GRA5 در پلاسمید pTZ57R کلون گردید. به طور خلاصه پس از ریخته شدن مواد مورد نظر، که در جـــدول زیـــر آمده، در یک میکروتیوب ۰/۵ میکرولیـــتری، به طور شبـــانه در دمای ۲۲°C انکوبه شد و محصـــول واکنش اتصـــال تا مـــرحله بعـــد در ۲۰°C- نگهـــداری گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

ماده	مقدار
ligation buffer 10X	lµ6
T4DNA ligase	lµ1
pTZ57R/T	lµ3
PCR Production	lµ10
ddH2o	lµ10

انتقال پلاسمید کلون شده به باکتری مستعد OP10(Transformation): یک میکروتیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سلول مستعد نگهداری شده در $-۷۰^{o}C$ را به مدت نیم ساعت درون یخ گذاشته تا به دمای صفر درجه سانتیگراد برسد. ۵ تا ۱۰ میکرولیتر محصول واکنش اتصال به میکروتیوب اضافه و به آرامی با هم مخلوط و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در یخ گذاشته شد. در مرحله بعد مخلوط فوق را به مدت ۹۰ ثانیه در دمای $۴۲^{o}C$ شوک حرارتی داده و بلافاصله به مدت ۲-۳ دقیقه بر روی یخ قرار دادیم. با این تکنیک، پلاسمید نوترکیب وارد باکتری می شود. ۵۰۰ میکرولیتر محیط LB مایع بدون آنتی بیوتیک را به مخلوط فوق اضافه کرده و به مدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار در $۳۷^{o}C$ قرار دادیم. حدود ۳۰۰ میکرولیتر از مایع را دور ریخته و مابقی درون میکروتیوپ را آن قدر مخلوط می کنیم تا رسوب کاملاً حل شود.(۲۲)

غربال کردن کلونی های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب: برای بررسی وجود یا عدم وجود قطعه مورد نظر، این باکتری ها در محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین، سوبسترای X-gal (۵-برمو ۴-کلرو ۳-ایندولیلD-β گالاکتوپیرانوزید) و IPTG به روش زیر کشت داده شدند. در زیر هود و شرایط استریل، مقدار ۲۰۰-۱۰۰ میکرولیتر از محصول بالا(سلول های ترانسفورم شده) به یک پلیت حاوی آنتی بیوتیک، X-Gal و IPTG اضافه و به کمک میله شیشه‌ای در تمام نقاط پلیت پخش گردید. پلیت ها به طور شبانه(۱۸-۱۶ ساعت) در انکوباتور $۳۷^{o}C$ قرار داده شد. سپس به مدت چندین ساعت در دمای $۴^{o}C$ قرار داده شد تا کلنی‌های آبی(کلنی فاقد پلاسمید نوترکیب) یا سفید(کلنی حاوی پلاسمید نوترکیب) ظاهر شوند. در این محیط کشت، کلنی های فاقد پلاسمید نوترکیب به رنگ آبی و کلنی های حاوی پلاسمید نوترکیب به رنگ سفید خواهند بود.(۲۲،۱۷)

روش‌های تأیید کلونینگ:

مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های آبی و سفید: پلاسمیدهای موجود در کلنی های سفید(به علت وجود قطعه کلون شده در آن) سنگین تر از پلاسمیدهای موجود در کلنی های آبی هستند،(۱۶). برای این منظور پلاسمیدهای استخراج شده از پلاسمید کلنی های آبی و سفید بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد لود شده و مقایسه گردیدند.

تکنیک PCR: پلاسمیدهای نوترکیب مورد نظر از سایر پلاسمیدها جدا شد. واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با شرایط مذکور در قسمت ۴-۲ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و ۳ میکرولیتر پلاسمید استخراج شده از کلنی های سفید، به عنوان الگو صورت گرفت.(۲۲)

تعیین توالی DNA: قطعه کلون شده در پلاسمید pTZ57R با استفاده از پرایمرهای عمومی پلاسمید، تعیین توالی و با سویه RH استاندارد توکسوپلاسما گوندای در بانک ژنی مقایسه شد و در bankit با شماره دستیابی JF501522 ثبت گردید.

ساب‌کلون ژن GRA5 در پلاسمید بیانی pcDNA3: در این روش وجود قطعه خارجی در ناقل پلاسمیدی بررسی می شود. بر اساس جایگاه های برش آنزیم که در روی ناقل پلاسمیدی(pTZ57R/T) وجود دارد، می توان قطعات حاصله از هضم آنزیمی را پیش بینی نمود. به همین منظور، پلاسمید نوترکیب همزمان با ناقل پلاسمیدی(به عنوان شاهد) توسط یک یا دو آنزیم برش داده شد. سپس نمونه های آنزیم زده

Archive of SID

www.SID.ir

همراه با یک نشانگر وزن مولکولی(مارکر) الکتروفورز گردید و مورد بررسی قرار گرفت.(۱۷)

برش آنزیمی پلاسمید pTGRA5 و جدا کردن قطعه GRA5: براساس دستورالعمل کیت شرکت Fermentas واکنش آنزیمی شامل ۲۵ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب pTGRA5، ۱ میکرولیتر آنزیم EcoRI، ۱ میکرولیتر آنزیم Hind3، ۸ میکرولیتر بافر تانگو و ۵ میکرولیتر آب مقطر تهیه و پس از ورتکس و spin، مخلوط فوق به طور شبانه در بن‌ماری ۳۷°C قرار داده شد. هم چنین پلاسمید pcDNA3 برای پذیرش قطعه GRA5 و انجام کلونینگ با آنزیم های فوق برش داده شد و نتایج برش آنزیمی هر کدام روی ژل ۱/۷ درصد آگاروز مشاهده گردید.

کلونینگ ژن GRA5 در پلاسمید pcDNA3 : برای این منظور، واکنش اتصال براساس دستورالعمل کیت(Fermentas) به حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر پلاسمید pcDNA3 آنزیم خورده، ۴ میکرولیتر ژن GRA5، ۱ میکرولیتر آنزیم T4DNA ligase، ۴ میکرولیتر بافر و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر تهیه و برای یک ساعت در ترموسیکلر ۲۲°C و بعد به طور شبانه در یخچال نگهداری شد.

انتقال پلاسمیدهای کلون‌شده داخل ناقل TOP10: انتقال پلاسمیدهای کلون شده pcGRA5 داخل ناقل TOP10 بدین نحو صورت گرفت که ۱۰ میکرولیتر از محصول اتصال به ۱۰۰ میکرولیتر باکتری مستعد اضافه و مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه انکوبه و در دور ۵ هزار به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر از مایع رویی را دور ریخته و بقیه آن نگهداری شد.

غربال کردن کلونی های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pcGRA5 : مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از باکتری های ترانسفورم شده را به پلیت LB حاوی آنتی بیوتیک(آمپی‌سیلین) اضافه کرده و با میله شیشه‌ای روی محیط جامد پخش و به طور شبانه در ۳۷°C انکوبه نمودیم. تنها باکتری های حاوی پلاسمید قادر به رشد بر روی محیط کشت حاوی آمپی سیلین می باشند.(۱۶)

روش‌های تأییدکننده کلون‌شدن قطعه GRA5 در پلاسمید بیانی pcDNA3

مقایسه باند پلاسمیدهای pcDNA3 و pcGRA5: محصول استخراج پلاسمیدهای pcDNA3 و pcGRA5 روی ژل آگاروز ۱ درصد لود و الکتروفورز شد.

PCR ژن GRA5 با استفاده از پلاسمید نوترکیب pcGRA5 به‌عنوان الگو: واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با شرایط مذکور در قسمت ۴-۲ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و پلاسمید pcGRA5، که با خلال دندان استریل برداشت شد، به‌عنوان الگو انجام گردید.

برش پلاسمید نوترکیب pcGRA5 با آنزیم های EcoRI وindH3: برش آنزیمی شامل ۲۵ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب pcGRA5، ۱ میکرولیتر آنزیم EcoRI، ۱ میکرولیتر آنزیم indH3، ۸ میکرولیتر بافر تانگو و ۵ میکرولیتر آب مقطر مطابق با شرایط فوق الذکر انجام و با استفاده از الکتروفورز روی ژل ۱/۷ درصد تایید گردید.(۲۲)

انتقال پلاسمید نوترکیب pcGRA5 به درون سلول یوکاریوتیک(Transfection): قبل از استفاده از محیط کشت، به‌ازاء هر ۱۰۰ میلی لیتر محیط DMEM، مقدار ۱۰-۵ میلی لیتر FCS استریل و یک میلی لیتر آنتی بیوتیک پنی سیلین به محیط اضافه شد. سلول یوکاریوتیک در این محیط در دمای ۳۷°C و ۵ درصد CO2 در فلاسک های ۷۵ میلی لیتری کشت داده شد. پس از هر ۲۴-۴۸ ساعت محیط کشت آن ها تخلیه و با محیط جدید جایگزین گردید.(۱۷)

در این مطالعه برای ترانسفکت سلول یوکاریوتیک از کیت Fugene 6 transfection reagent از شرکت Roche استفاده شد. طبق دستور شرکت سازنده روش استفاده از کیت ترانسفکت به این ترتیب است: یک روز قبل از ترانسفکت، تعداد ۱۰۶×۳-۱ سلول یوکاریوت در هر چاهک ۳۵ میلی متری از پلیت شش خانه‌ای کشت داده شد و به طور شبانه در ۳۷°C و ۵

Archive of SID

www.SID.ir

درصد CO2 انکوبه گردید. قبل از ترانسفکت می بایست سلول ها ۸۰-۵۰ درصد از پلیت را پر کرده باشند.

۱-برای ترانسفکت هر چاهک مقدار ۹۷ میکرولیتر محیط DMEM فاقد FCS درون یک ویال استریل ریخته و ۳ میکرولیتر معرف Fugene به آن اضافه شد و پس از آن ۱ ثانیه ورتکس و به مدت ۱۵-۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. نسبت مورد استفاده برای ترانسفکت ۳:۱ بود.

۲-برای هر چاهک ۳۵ میلی متری مقدار ۱ میکروگرم پلاسمید به مخلوط فوق اضافه شد و به آرامی با پیپت مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۱۵-۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید.

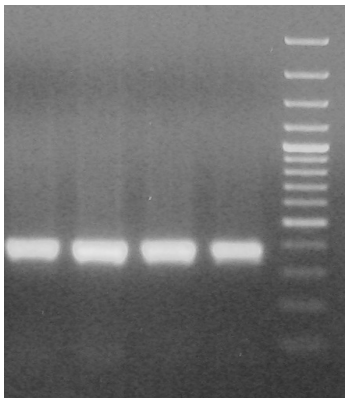
۳-چاهک حاوی سلول یوکاریوتیک را توسط پیپت تخلیه نموده و ۱ میلی لیتر محیط کشت DMEM(فاقد FCS) به چاهک اضافه و سپس محتویات ویال فوق را به آرامی در تمام سطح چاهک پخش و پلیت را به آرامی حرکت داده تا مخلوط در همه جای پلیت توزیع گردد. آن گاه پلیت در ۳۷°C و ۵ درصد CO2 به مدت ۷۲-۲۴ ساعت انکوبه گردید.

۴-پس از طی این مدت، سلول های ترانسکفت شده و سلول های ترانسفکت نشده در شرایط کاملاً استریل جمع آوری گردید. برای این منظور، ابتدا سلول ها با PBS شستشو شده و با اضافه کردن ۴۰۰ میکرولیتر PBS به هر چاهک، با نوک سمپلر سلول ها را از کف پلیت جدا کردیم. محتویات هر چاهک را چند بار از سمپلر گذرانده تا سلول ها جدا شوند و سپس محتویات هر چاهک در یک میکروتیوب ۱/۵cc جمع آوری گردید. سلول های مذکور تا زمان استفاده در ۲۰°C- نگه داری شد.

تایید بیان ژن GRA5 در سلول یوکاریوتیک: برای تایید بیان ژن در محیط کشت سلولی از چند روش استفاده می شود که مهم ترین آن ها روش وسترن بلات است. در این روش باندهای پروتئینی که در روی ژل آکریل آمید الکتروفورز شده‌اند به یک غشاء(مانند نیتروسلولز)، که قابلیت اتصال و تثبیت پروتئین را داشته، منتقل می شوند. در این روش ملکول های پروتئین از ژل خارج شده و در سطح غشاء در همان موقعیت قرار می گیرند. برای تشخیص پروتئین های منتقل شده به غشاء باید از لیگاندهای اختصاصی یا سوبسترای مربوطه استفاده شود. آنتی بادی ها از متداول ترین موادی هستند که در تشخیص اختصاصی پروتئین ها در غشاء به کار می روند.(۱۸،۱۹)

یافته های پژوهش

نتایج PCR به کمک DNA ژنومی: نتایج حاصل از واکنش PCR با DNA ژنومی وجود باند اختصاصی حدود ۳۶۳ جفت باز روی ژل آگاروز را نشان داد که هم اندازه ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندای است. بنابراین، پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر این ژن اختصاصی بودند.(شکل ۱)

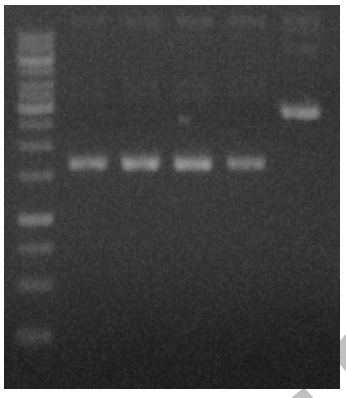


شکل شماره ۱. الکتروفورز محصول استخراج DNA ژنومی روی ژل آگاروز ۱/۵درصد، ستون شماره ۲،۳،۴،۵ قطعه GRA5 اندازه ۳۶۳ جفت باز، ستون ۱ مارکر ۱۰۰ جفت باز

Archive of SID

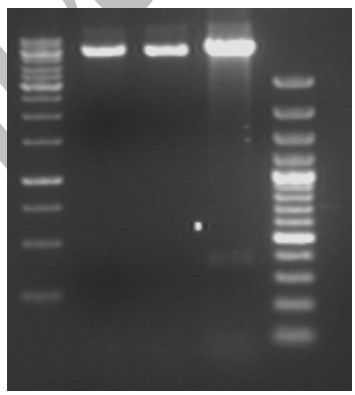
www.SID.ir

۲-۳. مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های سفید و آبی : کلنی های سفید و آبی روی محیط LB مایع حاوی آمپی‌سیلین و آغشته به X-gal و IPTG نشان‌دهنده ترانسفورماسیون موفق است. پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی های سفید به دلیل سنگینی در ژل آگاروز مقداری بالاتر از کلونی های آبی قرار گرفتند.(شکل ۲)



شکل شماره ۲. نتایج الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی ها روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد، ستون ۶ مارکر دارای ۱۰۰۰جفت باز، ستون ۲,۳,۴,۵ پلاسمید pTZ57R، ستون ۱ پلاسمید نوترکیب pTGRA5

برش آنزیمی پلاسمیدهای pTGRA5 دو باند نشان داد یک باند ۳۶۳ bp که هم اندازه ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندای و باند دیگر تقریباً هم اندازه pTZ57R بود. بنابراین، نتایج برش آنزیمی روی ژل آگاروز، کلون ژن GRA5 درون پلاسمید pTZ57R را تایید می نماید.(شکل ۳)



شکل شماره ۳. نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTGRA5 روی ژل آگاروز ۱/۷ درصد، ستون ۱ مارکر۱۰۰ جفت بازی، ستون ۴,۳ مونو دایجست پلاسمیدpcGRA5، ستون ۲ پلاسمیدpcGRA5 آنزیم خورده و ستون ۵ مربوط به مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی

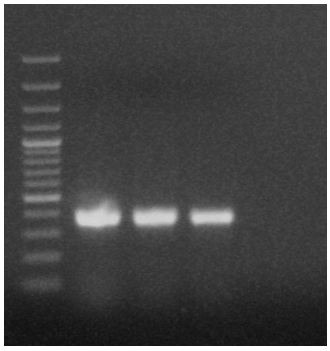
نتایج تعیین توالی: نتایج حاصل از تعیین توالی ژن GRA5 در پلاسمید pTZ57R نشان داد که این ژن دارای ۳۶۳ جفت باز بوده که با ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندای با شماره دستیابی EU918733.1 در بانک ژنی ۱۰۰ درصد تشابه داشت. توالی ژن GRA5 کلون شده توکسوپلاسما گوندای در این مطالعه در بانک ژنی با شماره دستیابیJF501522 ثبت شد.

نتایج ترانسفورماسیون باکتری ها با محصول واکنش اتصال: مرحله ظهور کلنی باکتری ها روی

Archive of SID

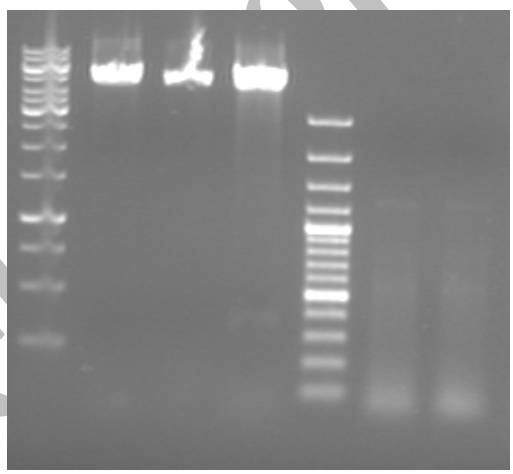
www.SID.ir

محیط LB حاوی آنتی بیوتیک آمپـــــی سیلین، نشان دهنده ترانسفورماسیون موفق پلاسمید در باکتری مستعد بود. پلاسمید pcGRA5 استـــــخراج شده از باکتری های ترانسفورم شده روی ژل آگاروز باندی را نشان دادند که تأییدکننده کلـــــون قطعه GRA5 در پلاسمید pcDNA3 بود.(شکل ۴)



شکل شماره ۴. نتایج الکتروفورز باند pcGRA5 روی ژل آگاروز ۱ درصد ستون ۱, ۲و۳

نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pcGRA5 : نتایج برش آنزیمیpcGRA5 با آنزیم های EcoRI و Hind3 دو باند را نشان داد که یکی حدود ۵۴۰۰ bp بود و باند دیگر حدود ۳۶۳ bp که برابر با قطعه GRA5 است. بدین ترتیب ساب کلون قطعه GRA5 درون pcDNA3 نیز تأیید گردید.(شکل ۵)



شکل شماره ۵ : ستون ۱و۲ مربوط به مونو دایجست pcDNA3 و ستون ۳ لادر ۱۰۰۰ جفت بازی و ستون های ۴و ۵و ۶ مربوط به دابل دایجست pcDNA3 و ستون ۷ لادر ۱۰۰ جفت بازی

نـــــتایج وســـــترن بلات: بـــه دنـــــبال انجـــــام SDS-PAGE با انجام تست وسترن بلات کاغذ رنگ گرفته نیتروسلولز باندهای قهوه‌ای رنگ را نشان می دهد، نوارها به داخل آب مقطر منتقل شده و بین دو کاغذ صافی خشک می شوند. کاغذ رنگ گرفته نیتروسلولز در تاریکی نگهداری شد تا رنگ ایجاد شده از بین نرود.

بحث و نتیجه گیری

توکسوپلاسموز نوعی بیماری زئونوزاست و داشتن واکســـــنی مؤثر می‌تواند اثـــــرات مفـــــیدی در جنبه های پزشکی و دام پزشکی داشته باشد. واکسن مؤثر انسانی بایستی در مرحله اول علاوه بر کاهش موارد ابتلا و مرگ ناشی از بیماری بتواند نسبت به کاهش بار بیماری در موارد مزمن که نیاز به مراقبت

Archive of SID

www.SID.ir

طولانی دارند تأثیرگذار بوده و از نظر اقتصادی به صرفه باشد.

برای مدت ۵۰ سال، آنتی ژن های خام به عنوان واکسن علیه توکسوپلاسموز مورد آزمایش قرار گرفته اند که مطالعات بر روی کارایی زیر واحدهای خالص یا ترکیبی جدید حدود ۱۰ تا ۲۰ سال سابقه دارد. واکسن‌های زیر واحدهای خالص دارای این مزیتند که حاوی آنتی ژن های ایمنوژنیک بوده، بدون این که آنتی ژن های غیر مرتبط ایجاد کننده تب در آن ها وجود داشته باشد. آنتی ژن هایی که پاسخ ایمنی محدودی می دهند با استفاده از مواد غیر طبیعی تقویت می شوند. این مواد به صورت ادجونت ها باعث ارتقای کارایی واکسن می‌شوند. در حال حاضر، تکنولوژی پیشرفته واکسیناسیون DNA آینده خوبی را برای توسعه و ایجاد واکسن های چند ظرفیتی پیشنهاد می‌کند، به طوری که این واکسن ها پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی پایدار و قوی ای را ایجاد می‌کنند،(۲۰). یکی از راه های مهم دست یابی به واکسن های چند ظرفیتی در مبارزه با توکسوپلاسموزیس استفاده از واکسن های DNA کوکتل می‌باشد که باعث ایجاد پاسخ های ایمنی-محافظتی طولانی مدت و مؤثر می‌شوند،(۲۱). به علت این که انگل های داخل سلولی نظیر توکسوپلاسما گوندای تعداد زیادی از اپی توپ های آنتی ژنیک را عرضه کرده و توانایی آن ها در عرضه آنتی ژن در میان افراد مختلف، بسیار متنوع می‌باشد، ایمونیزاسیون با واکسنی که پاسخ ایمنی را در مقابل طیف وسیعی از آنتی ژن ها تحریک کند بسیار مؤثرتر از واکسنی می باشد که فقط از یک آنتی ژن تشکیل شده و پاسخ ایمنی را بر ضد این آنتی ژن تحریک می‌نماید،(۲۱). از مزیت های دیگر واکسن DNA کوکتل این است که باعث تولید مقدار زیادی اینترفرون گاما شده و هم چنین باعث القای تولید آنتی بادی می‌گردد. این واکسن ها عمدتاً باعث تولید سایتوکین های Th1 می‌شوند و البته در مقدار کمتر سایتوکاین های Th2 را هم تولید می نمایند. از مزیت های دیگر واکسن DNA کوکتل جلوگیری از انتشار سیستماتیک انگل در بدن و افزایش بقاء و طول عمر می باشد،(۲۱). واکسن DNA کوکتل در مقدار کم باعث تحریک پاسخ های ایمنی هومورال و سلولی می‌شود در حالی که واکسن های تک ژنی با مقدار و دوز کم قادر به تحریک پاسخ های ایمنی نمی باشند و نیاز به دوز بالا دارند،(۲۱). با توجه به این واقعیات، واکسن DNA کوکتل یکی از امید بخش ترین استراتژی ها برای دستیابی به واکسن های مؤثر در مقابله با انگل های داخل سلولی(مانند توکسوپلاسما گوندای) می‌باشد. بر همین اساس، شناسائی ژن های انگل از اهمیتی خاص برخودار است. با توجه به آنالیز تعیین توالی ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندای در پلاسمید pTZ57R/T با استفاده از ژن استاندارد، مشخص شد که قطعه ۳۶۳ جفت بازی در این پلاسمید کلون شده است. هم چنین این ژن با سویه RH توکسوپلاسما گوندای با شماره دستیابی EU918733.1 در بانک ژنی دارای ۱۰۰ درصد تشابه بوده و این شباهت نشان دهنده حفظ توالی ژن در سویه های مختلف توکسوپلاسما گوندای می باشد. در برش آنزیمی قطعه bp ۳۶۳ جدا شد که هم اندازه ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندای بوده و در حقیقت ساب کلون این ژن را در پلاسمید pcDNA3 تأیید می‌نماید. نتایج حاصل از PCR پلاسمید pTGRA5 و pcGRA5 نشان داد، تنها ژن GRA5 تکثیر شده و هیچ ژن دیگری تکثیر نیافته است. نتایج این تحقیق بیانگر آن است که کلون این ژن در پلاسمیدها با موفقیت انجام شده است و با استفاده از روش وسترن بلات بیان پروتئین ۱۳ کیلو دالتونی تایید شد. بنابراین، می‌توان با استفاده از پلاسمیدهای نوترکیب برای تهیه واکسن علیه بیماری های انگلی در آینده امیدوار بود.

در مجموع، در این پژوهش ژن GRA5 توکسوپلاسما گوندی برای اولین بار به طور موفقیت آمیز در پلاسمید pTZ57R/T کلون شد که این پلاسمید می تواند برای مطالعات بعدی در جهت ساختن واکسن DNA مورد استفاده قرار گیرد.

سپاس گزاری

این طرح در قالب پایان نامه دانشجویی و با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

نویسندگان مقاله بر خود واجب می دانند مراتب تقدیر و تشکر خود را از جناب آقای دکتر صدرایی، آقایان پیرستانی و سروی و هم چنین کارکنان محترم گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس ابراز دارند.

References

1-Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K, Dlugonska H. Toxoplasma gondii: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. Exp Parasitol 2009 Sep;123(1):81-9.

2-Tan TG, Mui E, Cong H, Witola WH, Montpetit A, Muench SP, et al. Identification of T. gondii epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. Vaccine. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, N.I.H., Intramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 May 21;28(23):3977-89.

3-Qu D, Wang S, Cai W, Du A. Protective effect of a DNA vaccine delivered in attenuated Salmonella typhimurium against Toxoplasma gondii infection in mice. Vaccine [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Aug 18;26(35):4541-8.

4-Zhang J, He S, Jiang H, Yang T, Cong H, Zhou H, et al. Evaluation of the immune response induced by multiantigenic DNA vaccine encoding SAG1 and ROP2 of Toxoplasma gondii and the adjuvant properties of murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice. Parasitol Res. 2007 Jul; 101(2):331-8.

5-Hiszczynska-Sawicka E, Li H, Xu JB, Oledzka 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 Apr;124(4):365-72.

6-Flori P, Tardy L, Jacquet A, Bellete B, Hafid J, Raberin H, et al. Effect of rSAG-1(P30) immunisation on the circulating and tissue parasites in guinea pigs as determined by quantitative PCR. Parasitol Res 2006 May;98(6):511-8.

7-Jongert E, Melkebeek V, De Craeye S, Dewit J, Verhelst D, Cox E. An enhanced GRA1-GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-Toxoplasma immune responses in pigs. Vaccine 2008 Feb 20;26(8):1025-31.

8-Wang H, He S, Yao Y, Cong H, Zhao H, Li T, et al. Toxoplasma gondii: protective effect of an intranasal SAG1 and MIC4 DNA vaccine in mice. Exp Parasitol 2009 Jul;122(3):226-32.

9-Bhopale GM. Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. Microbes Infect 2003 Apr;5(5):457-62.

10-Saito S, Aosai F, Rikihisa N, Mun HS, Norose K, Chen M, et al. Establishment of gene-vaccinated skin grafting against Toxoplasma gondii infection in mice. Vaccine 2001 Feb 28;19(15-16):2172-80.

11-Jung C, Lee CY, Grigg ME. The SRS superfamily of Toxoplasma surface proteins. Int J Parasitol. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2004 Mar 9;34(3):285-96.

12-Letscher-Bru V, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Filisetti D, Antoni E, Villard O, et al. Vaccination with Toxoplasma gondii SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. Infect Immun 2003 Nov;71(11):6615-9.

13-Louis M. Weiss and Kami Kim. "Toxoplasma gondii The Model Apicomplexan Perspectives and Methods". 1st ed. Elsevier Ltd, 2007.

14-Brown HW, Nevia F. Toxoplasma gondii. Basic and Clinical Parasitology. 6th ed. Appelton centary- Crofts, Nerwalk Conection 1995.P.45-7.

15-Xue M, He S, Zhang J, Cui Y, Yao Y, Wang H. Comparison of cholera toxin A2/B and murine interleukin-12 as adjuvants of Toxoplasma multi-antigenic SAG1-ROP2 DNA vaccine. Exp Parasitol 2008 Jul;119(3):352-7.

16-Sambrook J, Fritsch E.F. and Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; chapter 1.pp.32, 123.

17-Solhjou K. Preparation and evaluation of DIG-ELISA for serodiagnosis of toxoplasmosis. Thesis for MSc. Tarbiat Modares University, October 2000. (Persian)

Archive of SID

www.SID.ir

18-Mostafaei A. Theoretical and practical guide to protein gel electrophoresis. Yadavaran Publication, Tehran 2003. (Persian)
19-Dunbar BS. Protein blotting: a practical approach. Oxford University Press 1994.pp. 569-88.
20-Kofta W, Wedrychowicz H. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. Vet Parasitol [Research Support, Non-U.S. Gov't Review] 2001 Sep 12;100(1-2):3-12.
21-Fachado A, Rodriguez A, Angel SO, Pinto DC, Vila I, Acosta A, et al. Protective effect of a naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice. Vaccine [Research Support, Non-U.S. Gov't] 2003 Mar 28;21(13-14):1327-35.
22-Masbi N, Ghafarifar F, Sharifi Z, Dalimi A, Vazini H. Cloning and characterization of GRA4 gene of Toxoplasma gondii (RH strain) in expression eukaryotic vector pcDNA3, Daneshvar. 2010;17(85):1-8. (Persian)

Archive of SID

www.SID.ir

Cloning of Toxoplasma Gondii Granular Antigen 5(GRA5) in Expression Eukaryotic Plasmid pcDNA3 and its Expression on CHO Cell

Naserifar R[1], Ghaffarifar F[1], Dalimi Asl A[1], Sharifi Z[2]*

(Received: 16 Apr. 2011 Accepted: 18 Dec. 2011)

Abstract

Introduction: Toxoplasmosis is a one of the most world-wide spread zoonosis representing a very serious clinical and veterinary problem. Toxoplasma gondii is an intracellular parasite that causes severe neurologic and ocular disease in immune compromised and congenitally infected individuals. The heavy incidence and severe or lethal damages of toxoplasmosis clearly indicate the need for the development of a more effective vaccine human vaccines are not available and current anti-toxoplasma treatment is disappointing. Immunization with plasmid DNA, a relatively novel technique, is a promising vaccination technique. To improve the immune response by DNA vaccination various is one of the key for the success of the vaccine in the field. One of the most efficient ways to control this disease is immunization. However, so far, there is no effective vaccine available against this pathogen. An important source of human contamination with T. gondii is the consumption of raw or undercooked meat products. Toxoplasma gondii are widely prevalent in humans and other animals which can cause severe or lethal toxoplasmosis. So, the development of a more effective vaccine is needed urgently .Therefore, we prepare gra5 plasmid to use as a vaccine.

Materials & Methods: In this study, GRA5was cloned in pTZ57R; afterwards, it was transformed into TOP10 strain of E.coli Bacteria. The recombined plasmid extracted from E.coli bacteria and amplified through PCR technique. Besides, pcDNA3 Plasmid for receiving and cloning of GRA5 segment was digested by Hind3 & EcoRI enzymes. GRA5 was sub-cloned into pcDNA3 and the reaction ligation product was transformed for the above bacteria. The bacteria grew in LB culture with ampicillin. Recombined pcGRA5 plasmids were purified from E.coli by Plasmid extraction kit. Finally, recombinant plasmid using cell culture method was expressed in Cho cell.

Findings: The accuracy of the results was confirmed by using restriction enzymes and PCR methods. GRA5 was cloned into expression eukaryotic plasmid pcDNA3. After sequencing pcGRA5 plasmid for cell expression Western blot method was used.

Discussion & Conclusion: The results showed that cloning and transformation of fragment GRA5 in pcDNA3 was done properly.

Keywords: Immunization, GRA5, toxoplasma gondaii, n expressio cell, DNA

1.Dept of Parasitology, Tarbiat Modares University of medical Science,Tehran,Iran
2.Dept of Virology, Blood Transfusion Center, Tehran, Iran
**(corresponding author)*

Archive of SID

www.SID.ir