Archive of SID

مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۰، شماره۸، آبان ۱۳۹۴(شماره پی در پی۱۰۳)

کلون کردن اپیتوپ‌های خطی آنتی‌ژن P14-3-3 در وکتور pEGFP-N1 به عنوان یک مدل واکسن DNA جهت القا ایمنی علیه کیست هیداتیک و بیان آن در رده سلولی CHO

رقیه مصری[۱]، مجید اسمعیلی زاد[۲*]، سید عبدالحمید انگجی[۱]، محمد طهماسب[۱]، مژگان احمدزاده[۱]، سمیه محمدی[۱]

[۱]گروه سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران، [۲] آزمایشگاه مرکزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، البرز، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۳/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۹

چکیده

زمینه و هدف: کیست هیداتیک در اثر آلودگی با لارو انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود. در مرحله لاروی این انگل آنتی‌ژن‌های متعددی تولید می‌شود که یکی از این آنتی‌ژن‌ها، آنتی‌ژنی از خانواده پروتئین‌های p14-3-3 می‌باشد و واکسن نوترکیب آن ایمنی‌زایی قابل توجهی را در موش القا کرده است. با توجه به ایمونوژن‌تر بودن نواحی اپی‌توپی آنتی‌ژن‌ها و تولید پاسخ ایمنی Th1 مطلوب هدف از این مطالعه کلون کردن اپی‌توپ‌های خطی این آنتی‌ژن شناسایی شده در وکتور pEGFP–N1 بود که در ساخت یک مدل DNA واکسن مؤثر بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی پس از شناسایی اپی‌توپ‌های خطی آنتی‌ژن p14-3-3 *توسط* نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی، توالی کدکننده آن به صورت سنتتیک فراهم شد، پس از تکثیر با واکنش PCR و هضم توسط آنزیم محدود کننده *Xho*I ، *در* وکتور pEGFP–N1 تخلیص شده با روش سمبروک تغییر یافته که همراه با استفاده از CaCl2 و PEG6000 می‌باشد کلون شده و کلونی‌های مثبت حاوی وکتور نوترکیب ابتدا به روش colony PCR و سپس توالی‌یابی تأیید شد. برای بررسی بیان در سلول‌های یوکاریوت با روش الکتروپوریشن به رده سلولی CHO منتقل شدند.

یافته‌ها: توالی کد کننده اپی‌توپ‌های خطی آنتی‌ژن P14-3-3 انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس پس از شناسایی، سنتز و تکثیر در وکتورpEGFP-N1 که تخلیص آن با روش جدید به خوبی با حداکثر غلظت پلاسمید و حداقل مقدار RNA همراه است، کلون شده و پس از تأیید کلونینگ، بیان آن نیز در رده سلولی CHO به عنوان نمونه‌ای از سلول‌های یوکاریوت به صورت موفقیت‌آمیز با میکروسکوپ فلورسنت انجام شد و استفاده از سازه حاصل در قالب واکسن ژنی برای بررسی پاسخ ایمنی در مدل‌های موشی در مراحل بعدی پژوهش انجام خواهد شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از توالی یابی، تأیید کننده کلونینگ صحیح توالی کد کننده اپی‌توپ‌های خطی آنتی‌ژن ζ P14-3-3 انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس در وکتور pEGFP-N1 بوده و نتایج حاصل از میکروسکوپ فلورسانس نشانگر بیان موفقیت‌آمیز پروتئین نوترکیب در سلول یوکاریوتیCHO می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اکینوکوکوس گرانولوزوس، کلونینگ، DNA واکسن،P14-3-3

*نویسنده مسئول: **مجید اسمعیلی‌زاده**، البرز، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، آزمایشگاه مرکزی

Email:m.esmaelizad@rvsri.ac.ir

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 11:15 IRST on Sunday December 13th 2015

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 11:15 IRST on Sunday December 13th 2015

مقدمه

کیست هیداتیک یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است که در اثر آلودگی با لارو انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس (*Echinococceus granulosus*) ایجاد می‌شود و علی‌رغم تلاش‌های بسیار در زمینه تشخیص‌های کلینیکی، کنترل و درمان، هم‌چنان در اکثر کشورهای نواحی معتدله جهان و مخصوصاً ایران که صنعت دامپروری رایج است در حال افزایش است. این بیماری سالانه خسارات اقتصادی زیادی را به این مناطق تحمیل می‌کند به طوری که این خسارت در ایران بالغ بر ۲۳۶ میلیون دلار در سال می‌باشد(۳-۱).

یکی از مراحل اساسی در کنترل و پیشگیری از شیوع این بیماری، طراحی و ساخت واکسنی مؤثر علیه آن می‌باشد. برای این منظور از سال ۱۹۹۵ طراحی و ساخت واکسن‌هایی بر مبنای آنتی‌ژن‌های نوترکیب این انگل *مثل:* EgTrp، EgA3T Eg101 و Eg95 آغازشد، اما با توجه به این که این انگل دارای ده نوع سروتیپ متفاوت(G1-G10) می‌باشد که هر کدام میزبان‌های واسط خاصی را آلوده می‌کنند(G2،G1 گوسفند، G6 شتر، G4 اسب و...) واکسنی مانند Eg95 توانسته تنها در گونه‌های گوسفندی که با G1 آلوده شده‌اند، ایمنی در حد ۹۵ درصد را ایجاد کند و هنوز واکسن مناسبی که بتواند در میزبان‌های مختلف علیه سروتیپ‌های متفاوت این انگل ایمنی ایجادکند طراحی نشده است(۷-۴). با توجه به این که این انگل دارای مراحل زندگی مختلفی است(مرحله تخم و بلوغ در میزبان نهایی یعنی سگسانان مرحله لاروی یا متاسستود و پروتواسکولکس در میزبانان واسط) واضح است که یافتن آنتی‌ژنی که بتواند در اکثر مراحل زندگی انگل وجود داشته و در عین حال دارای ساختار محافظت شده بوده ودر بین اکثر گونه‌ها نیز وجود داشته باشد، نسبت به آنتی‌ژن‌های دیگر مزایای بیشتری خواهد داشت. یکی از این آنتی‌ژن‌ها که در اکثر مراحل زندگی انگل و به ویژه در مرحله لاروی آن وجود دارد آنتی‌ژن P14-3-3 است. این آنتی‌ژن از خانواده پروتئین‌هایی است که تقریباً در همه یوکاریوت‌ها با ایزوفورم‌های متفاوت و به صورت حفظ شده وجود دارد(۹ و۸). حضور این پروتئین‌ها با توجه به نقش آن‌ها به عنوان مولکول‌های تنظیمی اصلی در رشد و تکامل انگل‌ها، آنها را به عنوان یکی از کاندیدهای هدف برای طراحی دارو و واکسن قرار داده است به طوری که واکسن نوترکیب rEg14-3-3 ساخته شده توانست پاسخ ایمنی سلولی و هومورال قابل توجهی را علیه کیست هیداتیک در موش‌های آلوده ایجاد کند(۱۰). با توجه به نقش عمده ایمنی سلولی، سلولT کمکی۱ (Th1) در مقابله با عفونت‌های انگلی و مشکلات موجود در زمینه ساخت و عرضه پروتئین‌های نوترکیب و با توجه به اینکه آنها بیشتر ایمنی هومورال را تحریک می‌کنند طراحی و ساخت واکسن‌هایی با توانایی تحریک و تولید پاسخ ایمنی سلولی بالا با کمترین هزینه و قابل دسترس برای عموم ضروری به نظر می‌رسد. در حال حاضر واکسن های نسل سوم یعنی واکسن های بر پایه

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 11:15 IRST on Sunday December 13th 2015

DNA(DNA vaccine) کـه در آن تـوالی DNA کدکننـده آنتی‌ژن مورد نظر در یک وکتور بیـانی کلـون شـده و جهت بیان و تحریـک پاسـخ ایمنـی بـه سـلول میزبـان انتقـال داده مـی‌شـود، بهتـرین گزینـه‌ی مطـرح مـی-باشـد(۱۴ـ۱۱). هـدف از مطالعـه حاضـر طراحـی و ساخت واکسن ژنـی مـؤثر علیـه کیسـت هیـداتیک بـر مبنای کلونینگ توالی کدکننده اپیتوپ‌های خطـی آنتـی-ژن *P14-3-3ζ* که ایمنوژن‌تر می‌باشد در وکتور بیـانی pEGFP-N1 (که دارای پروتئین سـبز فلورسـنت بـوده و در نتیجـه امکـان ردیـابی بیـان آن در سـلول‌هـای یوکاریوت وجود دارد) می‌باشد که به منظور بررسـی بیان آن درسـلول‌هـای یوکـاریوت نیـزاز رده سـلولی CHO[1] استفاده شد.

روش بررسی

بـرای شناسـایی نـواحی اپـی‌تـوپی آنتـی‌ژن p14-3-3ζ، ابتدا توالی پروتئینی آنتـی‌ژن p14-3-3ζ، انگـل اکینوکوکوس گرانولوزوس از پایگاه بیوانفورمـاتیکی NCBI دریافت و سپس اپی‌توپ‌های خطی آن به وسیله نـرم‌افـزار بیوانفورمـاتیکی موجـود در سـایت IEDB شناسـایی و بهینـه سـازی کـدون‌هـای آن (codon optimization) انجام شد. پس از این مرحله تـوالی کد کننده این اپی‌توپ‌ها پـیش‌بینـی شـده و بـه وسـیله شرکت Genscript سنتز شد.

برای واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز(PCR)، جهـت تکثیـر قطعـه مـورد نظـر بـا واکـنش PCR[2] آغازگرهـای(Primers) پیشـرو شامل 5"TGCTCGAGATGGCGAAAACAG3" و معکـوس شـامل 5"GCCTCGAGCTGCACTTCCGCTATAG3"، کـه دارای جایگاه برش برای آنزیم *Xho*I می‌باشند، بـا نـرم افزار بیوانفورماتیکی Oligo طراحی و سنتز شد.

واکـنش PCR در حجـم نهـایی ۴۰ میکرولیتـر، حاوی ۰/۲۵ میلی‌مـولار از هـر dNTP، ۱۰ پیکومـول از هریک از آغازگرها، MgCl2 با غلظت ۱/۵ میلی‌مـولار، ۱ واحد آنزیم پلیمراز Taq (شرکت سیناژن)، ۵۰ نـانوگرم DNA الگوی سنتتیک و۴ میکرولیتر بافر ۱۰X می‌باشد.

پارامترهـای PCR شـامل دمـای واسرشـته (denaturation) اولیه ۹۴ درجـه سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشـته شـدن در دمـای ۹۴ درجـه سـاتی‌گـراد بـه مـدت ۱ دقیقـه، اتصـال پرایمـر(Annealing) آغـازگر در دمـای ۵۴ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویـل شـدن(Extension) در دمای ۷۲ درجـه سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۱۵ ثانیـه و پلیمریزاسیون نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مـدت ۵ دقیقـه بـوده اسـت. محصـول PCR پـس از الکتروفـورز ۵ میکرولیتـر از آن روی ژل آگـارز ۲ درصد و رنگ‌آمیـزی بـا اتیـدیوم بروماید زیـر نـور ماورابنفش(UV) مشاهده شد.[3]

در بررسی حاصل جهت خالص‌سازی وکتـور از جدیدترین روش تغییر یافتـه سـمبروک کـه شـامل؛ اسـتفاده از محلـول ۴ مـولار CaCl2 و PEG8000[3] جهـت حذف RNA های سبک و سنگین می‌باشد، استفاده شد،

1-Chinese hamster ovary
2-Polymerase chain reaction
3-Polyethylene glycol

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 11:15 IRST on Sunday December 13th 2015

با این تفاوت که به علت موجود نبودن PEG8000 و در نتیجه عدم امکان تهیه محلول PEG8000، ۲۰ درصد از محلول(SIGMA)PEG6000 با غلظت ۴۰ درصد استفاده شد و با کم‌ترین حجم کشت(۵میلی‌لیتر) بیشترین مقدار وکتور با حداقل مقدار RNA و هزینه ممکن بدون استفاده از کیت فراهم شد(۱۵).

برای کلونینگ محصول PCR در وکتور pEGFP-N1، ۱۰میکرولیتر از ناقل pEGFP-N1 تخلیص شده(با غلظت ۱۵۰نانو گرم در هر میکرولیتر) به همراه ۱۰میکرولیتر محصول PCR (با غلظت ۲۵۰ نانو گرم در میکرولیتر) در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر با ۱میکرولیترآنزیم محدودکننده *Xho*I (شرکت فرمنتاز) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ ساعت به صورت جداگانه هضم شدند، سپس ۵ میکرولیتر از محصول هضم آنزیمی وکتور جهت تأیید هضم، در ژل آگارز(SIGMA) ۱ درصد الکتروفورز شده و پس از تأیید در واکنش الحاق استفاده شد. واکنش الحاق با حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر حاوی ۹۰۰ نانوگرم از قطعه مورد نظر و ۶۰۰ نانوگرم از پلاسمید هضم شده و۵ واحد آنزیمDNA لیگاز T4 (شرکت فرمنتاز)، ۱میکرولیتر PEG ۴۰۰۰ و ۳ میکرولیتر بافرX۱۰ بود که در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ساعت انجام شد. محصول واکنش الحاق به باکتری اشریشیاکلی زیر گونه *DH5α* که به روش کلرید کلسیم مستعد شده بودند با روش شوک حرارتی منتقل شد. غربال‌گری همسانه‌های حاصل روی محیط LB (Luria Bertani) آگارحاوی ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین (SIGMA) انجام شد و پس از پاساژ، کلونی‌های مثبت به روش PCR مستقیم انتخاب شده و در نهایت به منظور تأیید همسانه‌سازی کلنی‌های مثبت در ۵ میلی‌لیتر محیط LB حاوی ۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر کانامایسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۸ ساعت در انکوباتور شیکردار کشت داده شده و تخلیص پلاسمید با روش جدید سمبروک انجام شد سپس با انجام واکنش PCR روی پلاسمیدهای تخلیص شده و هضم آنزیمی توسط آنزیم *Xho*I قرار گرفتن قطعه در ناقل پلاسمیدی تأیید وصحت نهایی همسانه‌ها با تعیین توالی به وسیله شرکت کره‌ای(Macrogene) انجام شد.

برای بررسی بیان پروتئین نوترکیب، سلول‌های رده‌ی CHO از بخش بانک ژن و سلول مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شده و در محیط کشت RPMI1640 (حاوی FBS10% ، استرپتومایسین و پنی‌سیلین ۱درصد) در انکوباتور حاوی 5CO2 درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. پس از رسیدن این سلول‌ها به تعداد ۸ میلیون سلول در هر میلی‌لیتر، با محلول PBS شست و شو داده شدند و پلاک سلولی حاصل در کووت مخصوص الکتروپوریشن با ۲۵ میکرولیتر وکتور نوترکیب(با غلظت ۸۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۸۰۰ میکرولیتر محیط فاقد سرم مخلوط شده وترانسفورماسیون آن با دستگاه(BIO RAD) آمریکا Gene pulser به روش شوک الکتریکی انجام شد. و پس از آن سلول‌های ترانسفورم شده مجدداً به مدت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 11:15 IRST on Sunday December 13th 2015

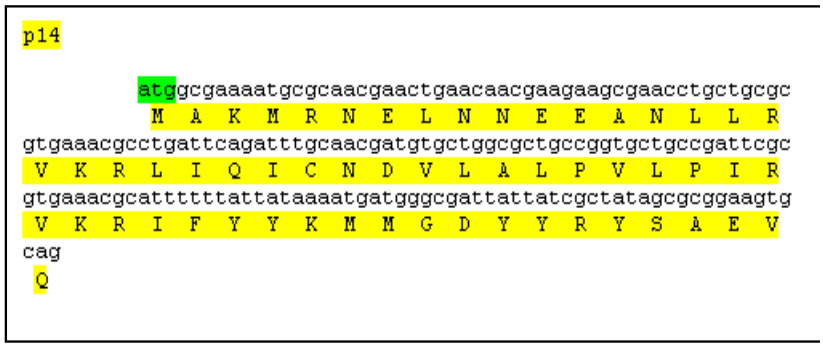
۷۲ ساعت در محیط RPMI1640 با شرایط ذکر شده کشت داده شد و پس از تهیه لام از سلول‌های حاصل، بررسی بیان پروتئین نوترکیب با میکروسکوپ فلورسنت انجام شد.

یافته‌ها

توالی کدکننده اپیتوپ‌های خطی آنتی‌ژن P14-3-3ζ اکی نوکوکوس گرانولوزوس سنتز شده و با روش PCR تکثیر یافت. در شکل ۱ توالی پروتئینی کدکننده و در شکل ۲ محصول PCR توالی کدکننده اپیتوپ‌های P14-3-3 با وزن مولکولی ۱۷۵ bp نشان داده شده است.

محصول PCR در ناقل pEGFP-N1 کلون شد. پلاسمید نوترکیب به روش لیز سلولی تخلیص شده و پس از هضم به وسیله آنزیم *Xho*I، باند DNA ژن کدکننده اپیتوپ‌های پیش‌بینی شده P14-3-3 از آن جدا شد که به همراه اختلاف اندازه ناقل قبل و بعد از همسان‌سازی نشانگر تأیید صحت کلونینگ بوده که در شکل ۳ نشان داده شده است و همان‌طور که درباند E شکل مشخص است مقدارRNA به طور قابل توجهی کاهش یافته است.

بیان پروتئین نوترکیب در سلول یوکاریوت در صورتی که جهت قطعه ورودی و در نتیجه قالب خواندن آن صحیح باشد، به صورت متصل به پروتئین سبز فلورسنت انجام خواهدشد که تصاویر حاصل از میکروسکوپ فلورسنت به وضوح نشانگر تأیید صحت کلونینگ و بیان پروتئین نوترکیب در رده سلولی CHO به عنوان نمونه‌ای از سلول‌های یوکاریوت می‌باشد.

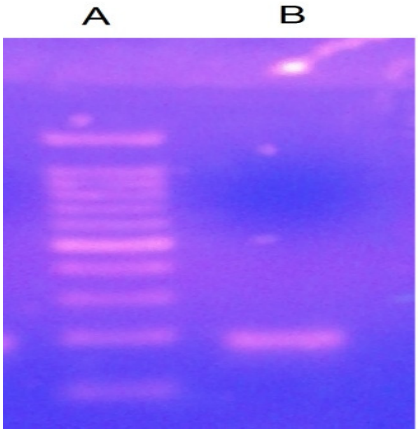


شکل ۱: توالی پروتئینی کدکننده اپیتوپ‌های خطی پیش بینی شده آنتی‌ژن P14-3-3ζ

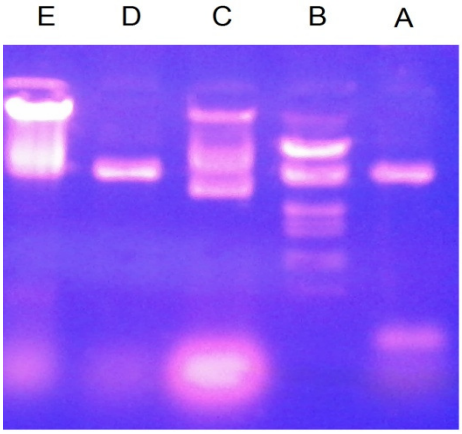
www.SID.ir

Archive of SID

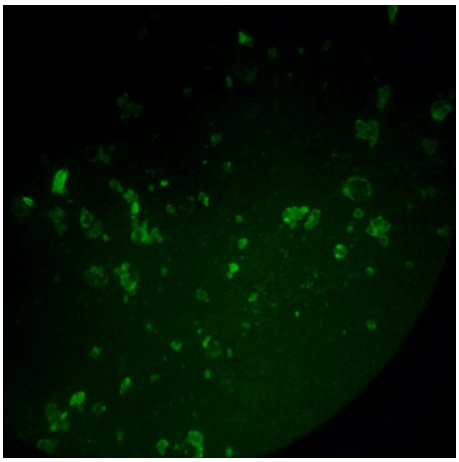
Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 11:15 IRST on Sunday December 13th 2015



شکل ۲: محصول PCR توالی کد کننده اپی توپ3-3-P14 بر روی ژل آگارز۲ درصد ، A: سایز مارکر DNA، ۱۰۰جفت باز، B :محصول PCR با وزن مولکولی ۱۷۵جفت باز



شکل ۳: ناقل pEGFP –N1 در ژل آگارز ۱ درصد. A : هضم ناقل پس از کلونینگ که باند پایینی مربوط به قطعه کلون شده و بالایی وکتور می‌باشد، B : سایز مارکر DNA از ۸۰۰۰ bp – ۵۰۰، C : پلاسمید ۴۹۴۰ bp تخلیص شده قبل از کلونینگ، D: pEGFP-N1 هضم شده توسط *Xho*I و E: pEGFP-N1 تخلیص شده پس از کلونینگ



شکل۴: تصویر پروتئین نوترکیب با پروتئین سبز فلورسنت با میکروسکوپ فلورسنت X۲۰

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 11:15 IRST on Sunday December 13th 2015

بحث

کیست هیداتیک به عنوان یک بیماری انگلی شایع بین انسان و دام است که درمان آن نیازمند پاسخ ایمنی قوی به وسیله میزبانان واسط یعنی انسان و نشخوارکنندگان می‌باشد(۱). در دنیای امروزی با توجه به افزایش بیماری‌های تضعیف کننده سیستم ایمنی مثل HIV و افزایش مصرف داروهای تضیف‌کننده این سیستم بنا به دلایلی مثل دریافت عضو یا بیماری‌های آلرژیک پیشگیری از این عفونت انگلی و کنترل آن امری ضروری می‌باشد. یکی از بهترین راه‌های پیش‌گیری همانند بسیاری از بیماری‌های دیگر طراحی و ساخت واکسن مناسب علیه آن می‌باشد(۱۰). هر چند واکسن‌های نوترکیب ساخته شده مثل *Eg95* در مقابله با این عفونت پاسخ ایمنی قابل توجهی را نشان داده‌اند(۱۶ و ۴)، اما یکی از بخش‌های مهم در بهینه‌سازی طراحی و ساخت این واکسن‌ها شناسایی و درک کامل از پاسخ ایمنی القا شده به دنبال واکسیناسیون می‌باشد. مطالعه‌های متعدد در رابطه با کیست هیداتیک، نشانگر نقش ایمنی سلولی Th1 در تضعیف و غیر فعال کردن این انگل و بسیاری از انگل‌های دیگر می‌باشد به طوری که در پی شیمی درمانی افرادی با پاسخ ایمنی Th1 قوی‌تر، نسبت به افراد دارای پاسخ Th1 ضعیف‌تر زودتر و بهتر بهبودی خود را به دست آورده‌اند(۱۳ و ۱۱). با توجه به این که واکسن‌های نوترکیب هم ایمنی سلولی و هم ایمنی هومورال را تحریک می‌کنند و اینترلوکین‌های ترشح شده از Th2 سبب تضعیف Th1و کاهش اینترفرون گاما می‌شود(۱۸ و ۱۷)، لذا درمان با مشکل مواجه خواهد شد. از طرفی در واکسن‌های قدیمی نیز فقط آنتی‌بادی خاصی در بدن تولید می‌شود که توانایی کنترل پاتوژن مشابه را ندارد(۱۹)، لذا با پیشرفت بیوتکنولوژی طراحی و ساخت واکسن‌هایی با هزینه مناسب یعنی واکسن‌های ژنی یا DNA vaccine که کارایی بالایی در تحریک ایمنی سلولی دارند آغاز شد(۱۲) در این نوع واکسن‌ها با توجه به اینکه آنتی‌ژن مورد نظر به وسیله سیستم بیانی میزبان بیان می‌شود، پس امکان تغییر آنتی‌ژن کدشونده وجود دارد و اگر طراحی واکسن بر اساس نواحی به شدت حفظ شده درآن خانواده باشد منجر به تولید آنتی‌بادی‌های وسیعی علیه پاتوژن مورد نظر خواهد شد(۱۹). هم‌چنین با توجه به این که این نوع واکسن‌ها بیشتر ایمنی سلولی Th1 را تحریک می‌کنند(۲۳-۲۰)، لذا برای مقابله با این عفونت انگلی، کارایی بالایی خواهند داشت. بر این اساس و با توجه به تحقیقات انجام شده در رابطه با تأثیر اپی‌توپ‌های خطی در القا پاسخ ایمنی مطلوب علیه این عفونت انگلی و تأکید محققین مبنی بر لزوم بررسی‌های بیشتر با اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن‌های مختلف، در این پروژه اپی‌توپ‌های خطی ایزوفورم ζ آنتی‌ژن p14-3-3 را که به شدت بین اکثر گونه‌ها حفظ شده می‌باشد، انتخاب شد، اما فقط اپی‌توپ‌های خطی آن که ایمنوژن‌تر است کلون گردید(۲۵ و۲۴). چون پروتئین نوترکیب این آنتی‌ژن ایمنی قابل توجهی را درموش‌های آلوده به کیست هیداتیک ایجاد کرده(۱۰) و DNA واکسن طراحی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 11:15 IRST on Sunday December 13th 2015

شده بر حسب آنتی‌ژن P14-3-3 انگل شیستوزوما جاپونیکم(Schistosoma japonicum) موجب پاسخ ایمنی مطلوبی علیه این عفونت انگلی شده است(۲۶). و با توجه به تعدد سروتیپ‌های انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس و با در نظر گرفتن این که پروتئین نوترکیب آنتی‌ژن p14-3-3 انگلSchistosoma bovis علیه انگل Schistosoma mansoni نیز ایمنی قابل ملاحظه‌ای را ایجاد کرده است(۲۷) و با توجه به این که سازه حاصل در رده سلولی CHO به عنوان نمونه‌ای از سلول‌های یوکاریوت بیان بسیار مطلوبی را نشان می‌دهد امید است که در مراحل بعدی آزمایش بتواند پس از بررسی در حیوانات مدل آزمایشگاهی و میزبانان واسط، پاسخ ایمنی Th1 را که ایمنی مطلوب علیه این عفونت انگلی می‌باشد القا نماید.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر اپی توپ‌های خطی ایزوفورم ζ آنتی‌ژنP14-3-3 که یکی از آنتی‌ژن‌های مهم و با ساختار حفظ شده انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس در بین اکثر گونه‌های آن می‌باشد، جهت القا پاسخ ایمنی علیه کیست هیداتیک در قالب یک مدل DNA واکسن در وکتور pEGFP-N1 کلون گردید. بررسی اولیه بیان آن در رده سلولیCHO، به عنوان نمونه‌ای از سلول‌های یوکاریوت نتایج موفقیت‌آمیزی را نشان داده و بررسی‌های بیشتر در رابطه با القا پاسخ ایمنی در حیوانات مدل آزمایشگاهی در مراحل بعدی آزمایش انجام خواهد شد.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه مصری کارشناس ارشد رشته ژنتیک از دانشگاه خوارزمی می‌باشد که با حمایت مالی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی که بخشی از طرح‌های تحقیقاتی این مؤسسه می‌باشد انجام شد که نویسنده ضمن تشکر ویژه از مسئولین این موسسه از تمامی همکاران عزیز بخش بیوتکنولوژی که صمیمانه ما را در اجرای این پروژه همراهی کردند، کمال تشکر و قدردانی را به عمل می‌آورد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 11:15 IRST on Sunday December 13th 2015

REFERENCES

1.Siracusano A, Teggi A, Ortona E. Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 2009; 12p.

2.Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. International Journal of Infectious Diseases 2009; **13**(2):125-33.

3.Harandi MF, Budke CM, Rostami S. The monetary burden of cystic echinococcosis in Iran. PLoS Neglected Tropical Diseases 2012; **6**(11): e1915.

4.Lightowlers M, Lawrence S, Gaucci C, Young J, Ralston M, Mass D'& Heath D. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. Parasite Immunology 1996; **18**(9): 457-62.

5.Obwaller A, Schneider R, Walochnik J, Gollackner B, Deutz A, Janitschke K, et al. Echinococcus granulosus strain differentiation based on sequence heterogeneity in mitochondrial genes of cytochrome c oxidase-1 and NADH dehydrogenase-1. Parasitology 2004; **128**(05): 569-75.

6.Heath D, Jensen O, Lightowlers M. Progress in control of hydatidosis using vaccination—a review of formulation and delivery of the vaccine and recommendations for practical use in control programmes. Acta Tropica 2003; **85**(2): 133-43.

7.Zhou B, Chen Y, Li W, Yang M. Construction and identification of the recombinant fusion gene vaccine Bb-Eg95-EgA31 of Echinococcus granulosus. Chinese Journal of Zoonoses 2009; **6**:004.

8.Siles-Lucas M, Merli M, Gottstein B. 14-3-3 Proteins in Echinococcus: Their role and potential as protective antigens. Experimental Parasitology 2008; **119**(4): 516-23.

9. Aitken A. 14-3-3 proteins: a historic overview. in Seminars in Cancer Biology 2006. Elsevier.

10. LI ZJ, Wang YN, Wang Q, Zhao W. Echinococcus granulosus 14-3-3 protein: A Potential vaccine candidate against challenge with echinococcus granulosus in mice. Biomedical and Environmental Sciences 2012; **25**(3): 352-8.

11.Yang Y, Ellis MK, McManus DP. Immunogenetics of human echinococcosis. Trends in Parasitology 2012; **28**(10): 447-54.

12.Maurya SH, Priya T, Hayat Khan K. Advanced in DNA vaccine against infection diseases international . Journal of Science Innovations and Discoveries 2013; 3(1) 34-48.

13.Ivory C, Chadee K. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. Genetic Vaccines and Therapy 2004; **2**(1): 17.

14. Sakai T, Hisaeda H, Nakano Y, Zhang M, Takashima M, Ishii K, et al. Gene gun-based co-immunization of merozoite surface protein-1 cDNA with IL-12 expression plasmid confers protection against lethal Plasmodium yoelii in A/J mice. Vaccine 2003; **21**(13): 1432-44.

15.Sauer ML, Kollars B, Geraets R, Sutton F. Sequential CaCl 2, polyethylene glycol precipitation for RNase-free plasmid DNA isolation. Analytical Biochemistry 2008; **380**(2): 310-4.

16.Woollard D, Gauci C, Heath D, Lightowlers M. Epitope specificities and antibody responses to the EG95 hydatid vaccine. Parasite Immunology 1998; **20**(11): 535-40.

17.Siracusano A, Delunardo F, Teggi A & Ortona E. Host-parasite relationship in cystic echinococcosis: an evolving story. Clinical and Developmental Immunology 2011; 12P.

18.Zhang W, Hao Wen,1 Jun Li,1,2 Renyong Lin,1 and Donald P. McManus2 Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. Clinical and Developmental Immunology 2011; 10P.

19.Flingai S, Czerwonko M, Goodman J, Kudchodkar SB, Muthumani K, Weiner DB. Synthetic DNA vaccines: improved vaccine potency by electroporation and co-delivered genetic adjuvants. Frontiers in Immunology 2013; 4:354.

20.Kuhs K, Ginsberg AA, Yan J, Wiseman RW, Khan AS, Sardesai NY, et al. Hepatitis C virus NS3/NS4A DNA vaccine induces multiepitope T cell responses in rhesus macaques mimicking human immune responses. Molecular Therapy 2011; **20**(3): 669-78.

21.Tabatabaie F, Mahdavi M, Faezi S, Dalimi A, Sharifi Z, Akhlaghi & Ghaffarifar F. Th1 Platform Immune Responses Against Leishmania major Induced by Thiol-Specific Antioxidant-Based DNA Vaccines. Jundishapur Journal of Microbiology 2014; **7**: 2.

22.Campbell K, Diao H, Ji J & Soong L. DNA immunization with the gene encoding P4 nuclease of Leishmania amazonensis protects mice against cutaneous leishmaniasis. Infection and Immunity 2003; **71**(11): 6270-8.

23.Tapia E, Pérez E, Laura López L, Gonzalo R, Magdalena M, Esteban M, et al. The combination of DNA vectors expressing IL-12+ IL-18 elicits high protective immune response against cutaneous

www.SID.ir

Archive of SID

leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK. Microbes and Infection 2003; **5**(2): 73-84.
24.Esmaelizad M, Ahmadian Gh, Aghaiypour Kh, Shamsara M, Paykari H and Tebianian M. Induction of prominent Th1 response in C57Bl/6 mice immunized with an E. coli-expressed multi T-cell epitope EgA31 antigen against Echinococcus granulosus. Folia Parasitol (Praha) 2013; **60**: 28-34.

25.Ma X, Zhou X, Zhu Y, Li Y, Wang H, Mamuti W, Li Y, Wen H. The prediction of T- and B-combined epitope and tertiary structure of the Eg95 antigen of Echinococcus granulosus. Experimental and Therapeutic Medicine 2013; **6**(3): 657-62.
26.Zhang Y, Taylor M, Johansen M, Bickle Q. Vaccination of mice with a cocktail DNA vaccine induces a Th1-type immune response and partial protection against Schistosoma japonicum infection. Vaccine 2001; **20**(5): 724-30.
27.Siles-Lucas M, Uribe N, López-Abán J, Vicente B, Orfao A[c], Nogal-Ruiz JJ, et al, The schistosoma bovis sb14-3-3 recombinant protein cross-protects against schistosoma mansoni in BALB/c mice. Vaccine 2007; **25**:7217–23.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 11:15 IRST on Sunday December 13th 2015

www.SID.ir

Archive of SID

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 11:15 IRST on Sunday December 13th 2015

Cloning Linear Epitopes of P14-3-3 Antigen into pEGFP–N1 vector as a DNA Vaccine Model to Induce Immuno immunity against Hydatidosis and its Expression in the CHO Cell Line

Mesri R[`], Esmaelizad M[2*], Angaji SA[1], Tahmaseb M[1], Ahmadzadeh M[1], Mohammadi S[1]

[1]Department of Cell and Molecular Biology, Kharazmi University, Tehran, Iran [2]Department of Central labratoary, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran.

Received: 6 June 2015 Accepted: 31 Aug 2015

Abstract

Background & aim: Hydatidosis is a zoonotic disease caused by infection with the larvae of Echinococcus granulosus. Different antigens produced in larval stage of this parasite that recombinant vaccine base these antigens created significant immunity in infected animals. One of the important antigens is p14-3-3 that its recombinant antigen created considerable immunity in mouse models. In the present study, according to the high immunity of antigen epitopes region, the coding sequence of T-cell epitopes of P14-3-3 was cloned into pEGFP-N1vector in order to produce an effective DNA vaccine model to stimulate high level of Th1 immune response.

Methods: In the current study, bioinformatics tools were used for the prediction of linear T-Cell epitopes of Echinococcus granulosus P14-3-3 antigen. The nucleotide coding sequence of these epitopes was synthesized by PCR. The ampliqon was digested with XhoI restriction enzyme and cloned into pEGFP–N1 vector which had been purificated by modified by the Sambrook method with CaCl2 and PEG6000.Positive colony was selected by direct colony PCR and confirmed by the sequencing. The evaluation of its expression in Eukaryotic cells was done by transformed of CHO cell line with electroporation.

Results: Linear T-cell epitopes of Echinococcus granulosus P14-3-3 after prediction, synthesis and amplification were successfully cloned into pEGFP-N1 vector that purificated by new method with maximum vector and minimum RNA concentration. The expression of new construct in CHO cell line as a eukaryotic cells achievement by fluorescent microscope will be used as a DNA vaccine model for the evaluation of immuno response in mouse models.

Conclusion: Successfully cloning of the linear T-cell epitppes coding sequence of Echinococcus granulosus P14-3-3 antigen into pEGFP-N1 verified by sequencing and fluorscent microscope images demonstrated the expression of recombinant protein in CHO cell line.

Key words: Echinococcus granulosus, DNA vaccine, cloning, P14-3-3

[*]**Correspondingauthers: Esmaeilzade M**, Department of Central labratoary, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran.
Email: m.esmaelizad@rvsri.ac.ir

Please cite this article as follows:
Mesri R, Esmaelizad M, Angaji SA, Tahmaseb M, Ahmadzadeh M, Mohammadi S. Cloning Linear Epitopes of P14-3-3 Antigen into pEGFP–N1 vector as a DNA Vaccine Model to Induce Immuno immunity against Hydatidosis and its Expression in the CHO Cell Line. Armaghane-danesh 2015; 20 (8): 666-676.

www.SID.ir