تولید کلون آنتی ژن سطحی SAG3 (P43) توکسوپلاسما گوندیی در وکتور بیانی یوکاریوتی

حسین ثباتی[1]، عبدالحسین دلیمی اصل[2*]، بهرام کاظمی[3]، فاطمه غفاری فر [2]

1. دانشجوی دکتری رشته انگل شناسی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
2. استاد گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
3. استاد گروه انگل شناسی ومرکز سلولی ومولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* نشانی برای مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، dalimi_a@ modares.ac.ir
دریافت مقاله: آبان هشتاد و نه پذیرش برای چاپ: دی هشتاد و نه

چکیده

سابقه وهدف: *نماینده آنتی ژنهای بزرگ سطحی تاکی زوییتهای توکسوپلاسما گونده ای SAG3, SAG1,SAG2 می باشند. ایمونوزاسیون با SAG1 ایمنی محافظت کننده ای را برعلیه عفونت کشنده درموشها ایجاد می کند. SAG3 خیلی شبیه به SAG1 در ساختمان ووظایف وکارکرد می باشد و می توان آن را بعنوان کاندیدایی جهت تهیه واکسن و تشخیص بیماری مورد استفاده قرار داد. هدف این مطالعه کلون نمودن آنتی ژن اختصاصی SAG3 (P43) توکسوپلاسما در وکتوربیانی یوکاریوتیpcDNA3 جهت تهیه پلاسمید نوترکیب حاوی این ژن است تابتوان از آن به عنوان DNA واکسن استفاده کرد.*

روش کار: *ژن SAG3 پس از تکثیر به روش PCR درپلاسمید pBluescript کلون شد. سپس درباکتری اشرشیا کلی سوش Top10ترانسفورم شد. پلاسمید نوترکیب پس از تکثیر از باکتری استخراج وژن هدف با استفاده از برش آنزیمی ، با آنزیمهای , BamHI HindIII از پلاسمید pBluescript جدا گردید. از طرف دیگر پلاسمید pcDNA3 برای Subclone قطعه SAG3 در آن با آنزیمهای BamHI , HindIII برش داده شد. SAG3 درون پلاسمید pcDNA3 ساب کلون شد واین محصول واکنش درباکتریهای فوق ترانسفورم شده ودر محیط LB آگار حاوی آمپی سیلین کشت داده شد. پلاسمیدهای نوترکیب pcSAG3 به وسیله کیت استخراج پلاسمید از باکتریها تخلیص شد.*

یافته ها: *پلاسمیدهای استخراج شده جهت تایید کار با روشهای PCR وبرش آنزیمی با کمک آنزیمها ی فوق با الکتروفورز تایید ونتایج نشان داد که قطعه SAG3 در پلاسمید pcDNA3 کلون شده است وباند حدود 1158جفت بازی روی ژل آگاروز ایجاد شده بود که هم اندازه ژن SAG3 توکسوپلاسما گونده ای است وتایید نهایی با استفاده از توالی یابی انجام شد.*

نتیجه گیری: *نتایج نشان داد که کلونینگ وترانسفورم قطعه SAG3 در پلاسمید pcDNA3 با موفقیت انجام شده است . لذا می توان ازآن بعنوان ابزار بالقوه ای درتشخیص وپیشگیری از ابتلا به عفونت توکسوپلاسما گونده ای به تنهایی ویا همراه با دیگر آنتی ژنهای انگل درانسان مورد استفاده قرار داد.*

واژگان کلیدی: *توکسوپلاسما گونده ای، ژن SAG3، کلونینگ ، pcDNA3*

مقدمه

توکسوپلاسموزیس یکی ازمعمول ترین بیماریهای انگلی است که در سرتاسردنیا وجود داشته ودر سطح گسترده درحیوانات وانسان ایجاد بیماری می نماید(1). درافراد بانقص ایمنی ،عفونت مزمن با این انگل می تواند دوباره فعال شده وایجاد انسفالیت نموده،که اغلب کشنده می باشد. عامل آن توکسوپلاسما گونده ای یک تک یاخته چند میزبانی اختیاری وداخل سلولی اجباری است و سیکل زندگی آن شامل میزبانهای قطعی وواسطه می باشد(1) . سیکل جنسی وغیر جنسی انگل در سلولهای اپیتلیال روده گربه(میزبان قطعی) ودیگر موجودات خونگرم مانند حیوانات وپرندگان (میزبان واسطه) انجام می شود(2). این طیف وسیع میزبانی آن را به یکی از موفق ترین انگلهای تک یاخته ای تبدیل کرده است . مطالعات قبلی نشان داده که عفونت انسانی می تواند با خوردن مواد آلوده به مدفوع گربه یا خوردن گوشت خام وانتقال جنینی از مادر به بچه ایجاد شود.

عفونتهای انسانی دردو فرم حاد ومزمن ایجاد می شود. بعد از شروع عفونت با پاسخ ایمنی ذاتی، تاکی زوییتها با تکثیر سریع چند تایی به بافتهای مختلف ازجمله مغز وعضلات از طریق خون ولنف وارد شده وسپس به برادی زوییت تبدیل شده که با تکثیر چند تایی کند تشکیل کیست بافتی را می دهند (3). عفونت طبیعی با این انگل ایجاد ایمنی غیر استریل می نماید. این محافظت وابسته به T-Cell های نوع CD4,CD8 می باشد. درمان این بیماری به خاطرآثارسمی داروهای در دسترس مشکل است. بنابراین تحت شرایط حاضر ایجادوگسترش داروهای جدید ضد توکسوپلاسما یا یک واکسن ،جایگزین بسیار مناسبی خواهدبود. واکسن برعلیه توکسوپلاسما گونده ای بایستی روی آنتی ژنهایی متمرکز شود که ایمنی وابسته به T-Cell ها را تولید می نماید. همچنین برای پیشگیری درعفونت جنینی وپیشگیری ازفعالیت دوباره درافراد با خطر بالا دارای ارزش باشد(4). تنها واکسن موجود تا کنون ،واکسن زنده تهیه شده ازتا کی زوئیتهای S48 است.

واکسنهای زنده خطر عفونت تصادفی وموتانتهای معکوس مضرغیر قابل پیش بینی برای انسان دارند. برای غلبه براین مشکلات،تحقیقات اخیر برروی واکسنهای ساب یونیت ،نوترکیب وواکسنهایDNA انجام می شود(5) . تکنولوژی پیشرفته واکسیناسیونDNA آینده خوبی رابرای توسعه وایجاد واکسنهای چند ظرفیتی ارائه کرده است(5). واکسیناسیون DNA بحث کاملا جدیدی است وروش قدرتمندی برای القای پاسخهای ایمنی هومورال وسلولی اختصاصی است که با تزریق پلاسمید DNA برهنه به درون میزبان، سلولهای میزبان پروتئین کدشده را بیان می کنند. ازجمله کاندیداهای واکسن،آنتی ژنهای سطحی انگل می باشند. آنتی ژنهای سطحی توکسوپلاسما گونده ای یک نقش مهمی دراتصال، علامت دهی،تهاجم،انتقال وواکنش با سیستم ایمنی میزبان بازی می کنند(6). نماینده آنتی ژنهای بزرگ سطحی تاکی زوییتهای توکسوپلاسما گونده ای SAG3 ,SAG1,SAG2 می باشند(7). ایمونیزاسیون با SAG1 ایمنی محافظت کننده ای را برعلیه عفونت کشنده درموشها ایجاد می کند. SAG3 خیلی شبیه به SAG1 در ساختمان ووظایف وکارکرد می باشد(7).SAG3درسطح تاکی زوئیتها،برادی زوئیتها واسپروزوئیتهای انگل توکسوپلاسما وجود دارد(8). ژن کدکننده SAG3 به صورت تک نسخه وفاقد اینترون می باشد. آنتی ژنهای SAG1,SAG3 به غشاء از طریق گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول متصل شده واین دو پروتیین نشان داده اند که در تهاجم واتصال به سلول نقش دارند ونقش اصلی اتصال به سلول راSAG3 نه SAG1 به عهده دارد. با بلوکه نمودن گیرنده های SAG3 با آنتی بادی دیده شد که تهاجم انگل به سلول بسیار کاهش می یابد. معذلک مطالعات کمی با SAG3 تاکنون انجام شده است. به منظوراینکه ژن SAG3 درسلول پوکاریوت مانند عضلات موش قابلیت بیان پیدا کند و بتوان از آن برای بررسی ا یمنی زایی استفاده کرد، کلون کردن ژن SAG3 درپلاسمید یوکاریوت اهمیت دارد . به این دلیل این مطالعه با هدف کلون کردن قطعهSAG3 درپلاسمید یوکاریوت بیانی pcDNA3 وترانسفورم این پلاسمید نوترکیب ، درباکتری E.coli سوش TOP10 انجام شد.

روش کار

برای تکثیر انگل توکسوپلاسما به هر موش 0/5سی سی مایع صفاقی حاوی 2×10^5 تاکی زوییت زنده به طور داخل صفاقی تلقیح شد وپس از گذ شت 4 روز ، مایع صفاقی موشهای آلوده به وسیله سرنگ جمع آوری شد. سپس 100میکرولیتر (حدود 5×10^7) از تاکی زوییتهای توکسوپلاسما از حفره صفاقی موشهای عفونت یافته ایزوله وچند بار با بافر PBS شستشو داده شد. تاکی زوییتهای تغلیظ شده داخل ویال 1/5سی سی ریخته شد وبا روش فنل کلروفرم DNA آن استخراج گردید (9) . DNA استخراج شده تا مرحله بعد در20- درجه نگهداری شد .

به منظور طراحی پرایمرهای رفت(Forward) وبرگشت(Reverse) ،ابتدا توالی DNA ژن کدکننده آنتی ژن SAG3 از اطلاعات بانک ژنی از سایت اینترنتی http//www.ncbi.com به صورت Compelet ' cds:1158 bp,RH strain با شماره AF340227 به دست آمد. سپس با استفاده از این اطلاعات وبه کمک نرم افزارGenRuner جفت پرایمرها به صورت زیر طراحی شدند.

5 ´-AAGCTTATGCAGCTGTGGCGGCGCAG-3F:

5 –GGATCCTTAGGCAGCCACATGCACAAG- R:

3

پرایمر رفت دارای 26نوکلئوتید وشامل جایگاه شناسایی برشی آنزیمی HindIII وپرایمر برگشتی دارای 27نوکلئوتید وشامل جایگاه شناسایی برش آنزیمی BamHI است .

برای انجام PCR واکنشی به حجم 30میکرولیترشامل 3میکرولیتربافر10X ، 1میکرولیتر کلرید منیزیم، 0/5میکرولیترdNTP ، 1میکرولیتر از هر یک از آغازگرها،1میکرولیتر ازDNA تخلیص شده، 0/25میکرولیترDNA پلیمرازTaq ، 22/25میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه شد.

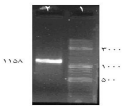
مواد فوق درون ویال ریخته شد وپس ازاسپین(Spin) در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد وطبق برنامه زیرPCR انجام شد. واسرشتگی اولیه5دقیقه دردمای 94 درجه سانتی گراد، واسرشتگی 30ثانیه دردمای 94 درجه سانتی گراد، اتصال 30ثانیه دردمای 68 درجه سانتی گراد، بسط 1دقیقه در دمای 72درجه سانتی گراد، سه مرحله اخیر در30 سیکل ودرنهایت واکنش PCR با بسط نهایی 5دقیقه در72 درجه سانتی گراد به اتمام رسید .

کلونینگ ژن SAG3 بـه کمـک کیـت کلونینـگ(T/A(Cloning Kit شـرکت Fermentas وبـه روش زیرانجـا م شـد . 1میکرولیترپلاسـمید pBluescript ،1میکرولیتـــــــــــــــرT4DNALigase ،1میکرولیتربـافر10XLigation ،1میکرولیتـرPEG ، 1میکرولیتـرآب مقطراستریل، 5میکرولیتر محصول PCR
مواد فوق درلوله میکروفیوژ0/5سی سی ریخته وبـه طـور شـبانه در دمـای 22^0C انکوبه شد.
ترانسفورماسیون به روش شوک حرارتی انجام شد . 100میکرولیتـر سـلول مستعد تازه تهیه وکل محصول کلونینگ به آن اضـافه وبـه آرامـی مخلـوط شدوبه مدت 30 دقیقه دریخ قرارگرفت . مخلوط فوق دردمای42^0C دربن ماری به مدت90ثانیه شوک حرارتی داده وسـپس دوبـاره 2دقیقـه دریـخ گذاشته شد . مقدار100میکرولیتـرLB مـا یـع بـدون آنتـی بیوتیـک بـه مخلوط اضافه وبه مدت 45دقیقـه درشـیکرانکوباتور37^0C گذاشـته شـد. سـپس روی پلیـت LB آگـار حـاوی 50میکـرو گـرم برمیلـی لیتـر(1میکرولیتردرهرمیلـی لیتـر)آمپـی سـیلین پخـش گردیـد. کلنـی هـای رشدکرده باIPTG,X-gal ازهم متمایز شدند. بطوریکه کلنی های سـفید شامل پلاسمید نوترکیب ازکلنی های آبـی فاقـد ایـن پلاسـمید نوترکیـب انتخاب شدند.
برای بررسی کلونی های حاوی پلاسمید نوترکیـب ،ایـن باکتریهـا بـا روش Rusconis وکشت در محیط حاوی آمپی سـیلین،X-gal (5-برمـو4- کلرو3-ایندولیل ß- D گالاکتوپیرانوزید همراه با یک القا کننـده آنـزیم یعنی IPTG (ایزوپروپیل تیوگالاکتوپیرانوید) مورد بررسی قرار گرفتند.
روش Rusconis یکـی از کـاربردی تـرین وسـریعترین روشـها جهـت تشخیص پلاسمید حاوی ژن می باشد(10). در این روش اول 12ماکرولیتر محلول Rusconis به میکروتیوب 500ماکرولیتری اضـافه مـی نمـاییم .دوم با کمک نوک Tip استریل ، کلنی باکتری حاوی پلاسمید نوترکیـب احتمالی را به محلول اضافه وبخوبی مخلوط می شود. سـوم کـشت مجـدد کلنـی بـرروی پلیـت حـاوی آمپـی سـیلین، X-ga وIPTG . چهـارم میکروتیوبها به مدت 10-5دقیقـه در دمـای اطـاق قـرار مـی گیـرد.پـنجم 2ماکرولیتر از مخلوط مساوی فنل-کلروفرم به میکروتیوبها اضـافه و4ثانیـه ورتکس می شود. شـشم میکروتیـوب در14000دور بـر دقیقـه بـه مـدت 2دقیقه سانتریفوژ می شود. هفتم الکتروفورز محلول رویی روی ژل آگـاروز 1٪ درکنار مارکر وپلاسمید انجام می شـود. در ایـن روش DNA ژنـومی باکتری حذف نشده وبهاز الکتروفورز درژل مشاهده می گردد. بـا توجـه بـه محل قرار گرفتن قطعه روی ژل کلنی های مثبت شماره گذاری می شود.
درروش محیط کشت بعلت اینکه درآنها بتاگالاکتوزیداز سنتز مـی شـود و X-gal را تجزیه می کنند وایندولیل تولید می شود رنـگ آن آبـی اسـت. درحالی که کلونی های حاوی پلاسمید نوترکیـب چـون قـادر بـه سـاخت بتاگالاکتوزیداز نیستند نمی توانند X-gal را تجزیه کنند، بنـابراین کلـونی های آنها سفید خواهد بـود . درزیـر هـود وشـرایط اسـتریل ، مقـدار100- 200میکرولیتر سلولهای ترانسفرم شده به یـک پلیـت حـاوی مـواد فـوق اضافه وبه کمک میله شیشه ای درتمام نقاط پلیت پخـش شـد. پلیتهـا بـه صورت وارونه وشبانه حدود16-18ساعت در 37^0C انکوبه شـد .سـپس بـه مدت چندساعت دردمای 4^0C قرارداده شد تاکلونی های آبی وسفید ظاهر شود.
استخراج پلاسمید از کلونی های آبی وسفید پس از کـشت شـبانه کلـونی های باکتریها در محـیط LB مـایع مطـابق دسـتورالعمل کیـت اسـتخراج پلاسمید شرکت بیونر(Bioneer) آلمان انجام شد. پلاسـمیدهای موجـود درکلونی های سفید به علت وجود قطعـه کلـون شـده درآنهـا سـنگین تـر ازپلاسمیدهای موجود درکلـونی هـای آبـی مـی باشـند . بـه ایـن منظـور پلاسمیدهای اسـتخراج شـده بـا روش روی ژل آگـاروز 0/8درصـد نمونـه گذاری وباهم مقایسه گردید .
پلاسمیدهای نوترکیب ازسایر پلاسمیدها جدا شد. واکنش PCR به حجـم 30میکرولیترمطـابق روش ذکرشـده دربـالا بـا اسـتفاده از پرایمرهـای اختصاصی و1میکرولیتر ازپلاسمید نوترکیب به عنوان الگـو اسـتفاده شـد. پلاسـمید نوترکیـب pBSAG3 بـا آنـزیم دو سـر قطعـه یعنـی HindIII,BamHI برش خورده وقطعه DNA خارج شـده از پلاسـمید پس ازالکتروفورز روی ژل مورد تایید قرار گرفت .
برای پیشگیری از هر گونه آلودگی ، پلاسمیدهای موجود درکلونی هـای سفید با کیت شرکت بیونر آلمان استخراج وبرای تعیین توالی بـه شـرکت ژن فـن آوران ارسـال وپـس ازانجـام آن بـه کمـک سـایت اینترنتـی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast از نظر تـشابهات واختلافـات بـا ژن SAG3 سویه RH توکسوپلاسما گونده ای مقایسه شد .
بـرای سـاب کلونینـگ SAG3 درپلاسـمید بیـانی یوکـاریوتی pcDNA3مراحل زیر انجام شد:
برش آنزیمی پلاسـمیدpBSAG3 وجـداکردن قطعـه SAG3: واکـنش آنزیمـی بـه حجـم 40 میکرولیترشـامل 10میکرولیترپلاسـمید نوترکیـب pBSAG3 ، 1میکرولیتر آنزیم HindIII ، 1میکرولیتر آنزیم BamHI ، 4میکرولیتر بافر تانگو و24میکرولیتر آب مقطر استریل تهیه وپس از پیپـت کردن وspin، مخلوط فوق حدود3-2ساعت دربن مـاری 37^0C قـرارداده شد . همچنین پلاسمید pcDNA3 برای پذیرش قطعه SAG3 وانجام کلونینگ تحت تاثیر آنزیمهای HindIII,BamHI با شرایط فـوق قـرار گرفت وبرش آنزیمی داده شد ونتایج برش آنزیمی هر کدام روی ژل آگاروز مشاهده واز ژل جدا وبـا کیـت تخلـیص شـرکت Bioneer ازژل تخلـیص گردید .
کلونینگ ژن SAG3 درپلاسمید بیانی یوکـاریوتی pcDNA3 : بـرای انجام این کار، واکنش بـه حجـم 20میکرولیترشـامل 3میکرولیترپلاسـمید pcDNA3 آنزیم خورده،9میکرولیتر ژن SAG3 ، 2میکرولیترآنزیم T4 DNALigase، 2میکرولیتربافر و4میکرولیترآب مقطر استریل تهیـه وبـه طور شبانه دردمای22^0C قرار گرفت .
انتقال پلاسمیدهای کلون شده به باکتری TOP10: انتقال پلاسمیدهای کلون شدهpcSAG3 داخـل ناقـل TOP10 براسـاس روش گفتـه شـده درقسمت بالا انجام شد .
غربال کردن کلونی های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیـب pcSAG3 بـا روش Rusconis وکـشت : مقـدار200میکرولیتـر ازباکتریهـای ترانـسفرم شده را روی پلیت LB آگار حاوی آمپی سیلین ریخته وبا میله شیـشه ای روی محیط جامد پخش وبه طور شبانه در 37^0C انکوبه شـد .باکتریهـایی که پلاسمید را دریافت کرده بودند قادر بودنـد روی محـیط کـشت حـاوی آمپی سیلین رشد کننـد. بـرای شناسـایی وتفکیـک کلـونی هـای حـاوی پلاسـمید نوترکیـب از کلـونی هـای فاقـد پلاسـمید نوترکیـب از روش Rusconis استفاده شد . کلنی های باکتریهای رشـد کـرده روی محـیط حاوی آمپی سیلین با روش Rusconis طبق روش گفته شده دربالا مورد بررسی قرار گرفت.
محـــصول اســـتخراج پلاســـمیدهای pcDNA3 وpcSAG3 روی ل آگاروز1درصد لود والکتروفورزشد .

واکنش PCR به حجم 30میکرولیتر مطابق با شرایط ذکرشده دربالا با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و1میکرولیتر ازپلاسمید نوترکیب به عنوان الگو انجام شد. برش آنزیمی به حجم 30 میکرولیتر شامل 5میکرولیتر پلاسمید نوترکیب pcSAG3،1میکرولیتر آنزیم HindIII،1میکرولیتر آنزیم BamHI،3میکرولیتر بافر تانگو و20 میکرولیتر آب مقطر استریل مطابق با شرایط ذکرشده دربالا انجام شد.

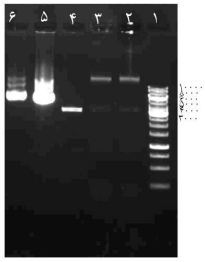
یافته ها

نتایج حاصل ازPCR نشان داد ، فقط یک باند حدود 1158جفت باز روی ژل آگاروز ایجاد شده بود که هم اندازه ژن SAG3 توکسوپلاسما گونده ای است وهیچ ژن دیگری غیر از آن تکثیر نشده بود، که این مسئله نشان دهنده اختصاصی بودن پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ژن SAG3 می باشد(شکل1).



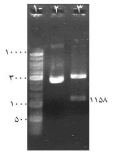
شکل1. نتایج PCR قطعه SAG3 ازروی DNA ژنومی با پرایمرهای اختصاصی ،ستون 1مارکر 1kbp ، ستون 2باند 1158bp قطعه SAG3

درنمونه گذاری روی ژل باند ایجادشده توسط کلونی های سفید حاوی پلاسمید نوترکیب بالاتر از (3000جفت باز) کلونی های آبی فاقد پلاسمید نوترکیب قرار می گیرند(شکل2).



شکل2. نتایج الکتروفورزتخلیص پلاسمید نوترکیب pBSAG3 ازکلنی های سفید وپلاسمید pBluescript ازکلنی های آبی،ستون1مارکر 1kbp ، ستون 2و3و4پلاسمید pBluescript ، ستون5و6 پلاسمید نوترکیب pBSAG3

برش آنزیمی پلاسمیدهای pBSAG3 دوباند را نشان می داد ،یک باند 1158 جفت باز که هم اندازه ژن SAG3 توکسوپلاسما گونده ای وباند دیگر تقریبا هم اندازه pBluescript بود . بنابراین نتایج برش آنزیمی روی ژل آگاروز، کلون ژن SAG3 داخل پلاسمید pBluescript را نشان داد (شکل 3) .



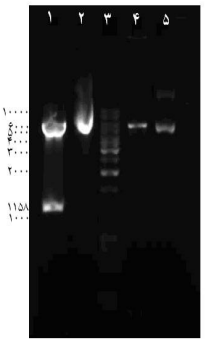
شکل3. نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیبpBSAG3 ، ستون3پلاسمید نوترکیبpBSAG3 برش خورده با دوآنزیم HindIII,BamHI ، ستون2پلاسمیدpBSAG3 آنزیم نخورده،ستون1 مارکر1kbp

نتایج حا صل از تعیین توالی ژن SAG3 در پلاسمید pBluescript نشان داد که این ژن با ژن SAG3 توکسوپلاسما گونده ای دارای شماره AF340227،AF340229 وAY187280 در بانک ژنی به ترتیب حدود 99درصد ، 99درصد و98درصد تشابه داشت(شکل 4) .

```
NNNNNNNNNCNNCNNNGNTTANGNNGTCGCGAGCTGGGGAGGCAGTCTTTGCCGCT
CGGGTGTTTTTTCGCGGCTTTTGGTTCGTGCGTGTTGTCTGCGATCTTGGGAACCGGAGA
GCACGGACTGTTCGTCGCCGCAGGTAAATCGAGAAGTAAGATAACTTATTTTGGCACGCT
CACTCAGAAGGCTCCGAACTGGTACGCTGCTCTTCAACGAGGGCGAAAGAAGAGGTCGT
AGGACATGTGACGCTGAACAAAGAGCACCCTGATATGACAATTGAATGCGTCGACGACG
GCTTGGGCGGAGAGTTTTTGCCGCTCGAAGGCGCGACGTCGTCGTACCCGCGAGTAGTC
ACATTGATGCCAAGGACAGGGGCGACTGCGAGCGCAACAAGGGCTTTCTGACCGACTAC
ATACCGGGCGCGAAGCAGTACTGGTACAAGATAGAAAAGGTGGAGAACAACGGCGAGC
AATCCGTTCTGTACAAATTCACAGTTCCTTGGATATTCCTTCCGCCCGCCAAGCAGCGATAC
AAGGTTGGATGCCGATACCGAACCACGAGTATTGCTTTGTTGAGGTCACCGTCGAACCCA
CGCCGCCAATGGTCGAAGGCAAGAGAGTGACCTGCGGGTACCCCGAGTCCGGCCCCGT
GAATCTCGAGGTGGACTTGTCAAAGGACGCGAACTTTATCGAGATTCGGTGCGGCGAAC
AGCACCACCCGCAGCCGTCGACCTACACGCTGCAGTACTGCTCAGGTGACTCGGTGGAC
CCGCAGAAGTGTTCGCCGCAGTCCCTGACGAACATTTTTTATGACTACAGCTCTTCGTGGT
GGAAGGGGAAACTGAACGGGCCTGACGGGGCAACTCTCACCATTCCACCCGGCGGGTT
CCCCGAAGAAGACAAATCTTTTCTTGTCGGGTGTTCACTCACTGTGGACGGGCCGCCCTT
```

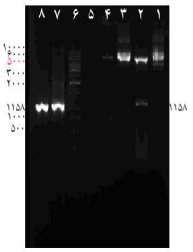
شکل 4. توالی ژن SAG3 در پلاسمید pBluescript

بررسی کلنی های باکتریها ی رشد نموده روی محیط LB آگار حاوی آمپی سیلین با تست Rusconis نشان داد که باند ایجادشده توسط کلونی های دارای پلاسمید نوترکیب درنمونه گذاری روی ژل نسبت به کلونی های فاقد پلاسمید نوترکیب بالاترودرحدود بیش از6000جفت باز بود که نشان دهنده ترانسفورماسیون موفق پلاسمید نوترکیب در باکتریها بود . پلاسمید pcSAG3 استخراج شده ازباکتریهای ترانسفرم شده روی ژل آگاروز در مقایسه با pcDNA3 مقداری بالاتر بود که تایید کننده کلون قطعهSAG3 درپلاسمید pcDNA3 بود (شکل 5).



شکل5: نتایج کلون قطعه SAG3 درپلاسمید pcDNA3 وبرش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pcSAG3 با آنزیمهای برشی ،ستون5 pcDNA3 ، ستون4 pcSAG3 آنزیم HindIII خورده ،ستون3مارکر 1kbp ستون 2 pcSAG3 آنزیم نخورده ، ستون1 pcSAG3 آنزیم HindIII,BamHI خورده

نتایج برش آنزیمی pcSAG3 با آنزیمهای HindIII وBamHI دو باند را نشان می داد که یکی حدود 5400جفت باز ودیگری حدود 1158جفت باز بود که برابر با قطعه SAG3 است وبه این روش ساب کلون قطعه SAG3 درون pcDNA3 تایید شد . نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR پلاسمید pcSAG3 ، با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده تنها یک باند را نشان داد که هم اندازه قطعه SAG3 بود، بنابراین ژن SAG3 از پلاسمید pcSAG3 به عنوان الگو استفاده کرده وتکثیر شده بود ، اما در نتایج حاصل از PCR پلاسمید pcDNA3 هیچ باندی دیده نشد (شکل6)



شکل6. نتایج برش آنزیمی و PCR پلاسمید نوترکیب pcSAG3 ،ستون1و3 pcSAG3 آنزیم نخورده ،ستون2 pcSAG3 دوآنزیم HindIII,BamHI خورده ، ستون4 pcSAG3 خطی شده با آنزیم HindIII ، ستون5 pcDNA3 ، PCR شده به عنوان کنترل ستون6مارکر 1kbp ،ستون7و8قطعه SAG3 1158pb، PCR شده درروی پلاسمید pcSAG3

بحث

توکسوپلاسموزیس از عفونتهای شایع انسان است که باعث مرگ ومیر وناخوشی درافراد دارای نقص ایمنی وعفونت های مادرزادی می شود. میزان عفونت وابتلای جنین بستگی به دوره بارداری دارد که مادر درآن دوره به عفونت مبتلا می شود. عفونت در سه ماه اول منجر به عوارض خطیر می شود. توکسوپلاسموزیس درافراد دارای نقص ایمنی مثل افراد مبتلا به ایدز یا بیماران نئوپلاستیک یا افرادی که پیوند قلب یا مغز استخوان داشته اند می تواند کشنده باشد. بنابراین تشخیص به موقع بیماری دراین افراد می تواند حیاتی باشد. اکنون مشخص شده که حیوانات وافراد عفونت یافته به فرم مزمن دارای ایمنی محافظتی طولانی مدتی برعلیه بیماری می باشند وپاسخهای ایمنی موثر، بوسیلهT-Cell های نوع CD4 وCD8که درارتباط با تولید گاما انترفرون می باشند تولید می شود(11). درحال حاضر یک واکسن زنده براساس سوشهای تخفیف حدت یافته توکسوپلاسما گونده ای درحیوانات اهلی بکار گرفته شده است. معذلک همه واکسنها برای انسان بعلت فعالیت دوباره واحتمال تبدیل شدن به فرم بیماریزا مناسب نمی باشد. استفاده ازآنتی ژنهای انگل برای واکسیناسیون به صورت مشکل باقی مانده زیرا استاندارد نمودن وروشهای تخلیص مشکل می باشد. به این دلیل استفاده از تکنولوژیهای نوترکیب وکلون وبیان ژنهای مفید بعنوان یک ابزار جالب و بالقوه برای توسعه واکسن برای انسان ضروری ولازم می باشد.

واکسیناسیون DNA روش قدرتمندی برای القای پاسخهای ایمنی سلولی وهومورال است که با تزریق پلاسمید DNA برهنه به داخل بدن میزبان، سلولهای میزبان پروتئین کدشده را بیان می کنند. درسالهای اخیر،فناوری پیشرفته واکسیناسیون DNA آینده خوبی را برای توسعه وایجاد واکسنهای چند ظرفیتی ارائه کرده است . به طوری که این واکسنها پاسخهای ایمنی هومورال وسلولی پایدار وقوی ایجاد می کنند. این انگل در انسان فقط با تستهای سرولوژیک تشخیص داده می شود و لذا آنتی ژنهای خاص ومعین درسیستم تشخیص آن بسیار ضروری است . درضمن بررسیها نشان داده که واکسینا سیون با آنتی ژنی که مخصوص یک مرحله از زندگی انگلی می باشد ایجاد پاسخ ایمنی کم اثر نموده که محدود به همان مرحله می شود . بنابراین واکسنهای تولید شده برعلیه آنتی ژنهایی از توکسوپلاسما گونده ای که قادر به تحریک پاسخ ایمنی از نوع Th1 بوده و در طی مراحل مختلف زندگی پارازیت بیان می شود می تواند محافظت بهتری رادر پیشگیری از عفونت ایجاد نماید.

اخیرا توجهات اصلی معطوف به مولکولهای سطحی پارازیت می باشد. آنتی ژنهای سطحی توکسوپلاسما نقش مهمی در اتصال،ارسال پیام، تهاجم، انتقال وواکنش با سیستم ایمنی میزبان دارند. سطح تاکی زوئیتها ،برادی زوئیتها و اسپروزوئیتها با آنتی ژنهایی که به GPI (گلیکوزیل،فسفاتیدیل اینوزیتول) سطح سلول متصل می باشند پوشیده شده که بنام SAG شناخته شده اند(12). در اتصال پارازیت به پروتئوگلیکانهای سطحی سلولهای هدف (هپاران سولفات پروتئوگلیکان HSPGs) دخالت داشته وموجب تهاجم وورود انگل به سلول میزبان می شود(12). بعضی ازاین مولکولهای اختصاصی، مراحل سیکل زندگی انگل مانند SAG1(30KDa)،SAG2(22KDa) وSRS3 پروتیینهای هستند که فقط در سطح تاکی زوییتها بوده ودر سطح برادی زوییتها

در ضمن مشخص شده که آنتی ژن SAG3 (P43) روی سطح تاکی زوییت،برادی زوییت واسپوروزوییت انگل توکسوپلاسما گونده ای وجود داشته وبیان می گردد . بیشتر مطالعات هم درباره کلون نمودن وبیان ژنهای پروتیینهای سطحی توکسوپلاسما انجام شده است. نماینده آنتی ژنهای سطحی بزرگ تاکی زوئیتهای توکسوپلاسما گوندی SAG1,SAG2,SAG3 می باشند. SAG1 تا حدی ایجاد ایمنی محافظتی برعلیه عفونت کشنده در موشها می نما ید . SAG3 خیلی شبیه به SAG1 در ساختمان ووظایف وکارکرد می باشد . ازنظرساختمانی حدود 24٪ مشابهت دراسیدهای آمینه دارند . ژن SAG3 یک پلی پپتید 359 آمینو اسیدی را کد می کند که حدود 1158bPمی باشد وقسمتی که به آمینوگلیکانهای سلول هدف باند می شود درحدود 967bP بوده که درمحدوده نوکلئوتیدهای 40تا359کل ژن وجود دارد(12). SAG1 و SAG3 نقشی دراتصال یا تهاجم به سلولهای میزبان دارند. SAG3 به عنوان یک آنی ژن بزرگ سطحی انگل توکسوپلاسما گونده ای شناخته شده وتا کنون کارهای کمی با آن انجام شده است. ازاین رو، به عنوان یک کاندیدا بر ای تهیه واکسن می تواند مطرح باشد. با توجه به این خصوصیات SAG3 ، می توان آن را به عنوان یک هدف جایگزین وهمراه با دیگر آنتی ژنها به عنوان واکسنهای کوکتل ونوترکیب بر علیه توکسوپلاسموزیس بکار برد . DZiersZinski وهمکاران نشان دادند که دو تا از آنتی ژنهای سطحی بنام SAG1 و SAG3 دارای مشابهت قابل توجهی در ساختما ن با 24٪ اسید آمینه های قابل شناسایی بوده که بنظر می رسد توپولوژی کلی خود را حفظ کرده اند . DZiersZinski نشان داد که نسبت تهاجم به سلولهای ماکروفاژ موشی وفیبروبلاستهای انسانی درموتانتهای فاقد SAG3 درمقایسه با نوع وحشی انگل حدود60-50٪ کاهش می یابد . این موتانتها عفونت ضعیف تری با یک کاهش قابل توجه در مرگ ومیر موشها را نشان دادند. این نتا یج مشخص کرد که SAG3 یکی از اعضای سیستم رسپتوری انگل بوده که به عنوان یک گیرنده منجر به شناخت سلولهای میزبان شده وموجب اتصال وافزایش تهاجم به آنها می شود. این مطالعه نشان داد که واکنش اختصاصی SAG3 با پروتوگلیکانهای سلول هدف منجر به جذب انگل به سلولهای میزبان شده و نقش اصلی اتصال به سلول راSAG3 نه SAG1 به عهده دارد . با بلوکه نمودن گیرنده های SAG3 با آنتی بادی دیده شد که تهاجم انگل به سلول بسیار کاهش می یابد (13) . Caetano وهمکاران نشان دادند که آدنوویروسهای نوترکیب بیان کننده SAG1,SAG2,SAG3 موجب ایجاد پاسخهای ایمنی سلولی Th1 برعلیه سه آنی ژن شده ودرموشها کاهش کیستهای مغزی تا80٪ را نشان می داد . Young و همکاران نشان دادند که ایمونیزه کردن موشها با SAG3 فیوژشده با GST (گلوتاتیون – اس – ترانسفراز)به عنوان واکسن نوترکیب به تنهایی ویا با ادجوانت QuilA درمقایسه با موشهای غیر ایمونیزه شده بطورمعنی داری بیشترین آنتی بادی IgG2a ، IgG,IgG1را تولید کرده ودرصد تی سلهای $CD8^+$ ، بیان mRNA تولید کننده IFN-γ وتولید نیتریک اکسید افزایش معنی داری را نشان می داد . همچنین نتایج حاصل ازآن بیشترین روزهای زنده بودن وکمترین کیستهای مغزی را بعدازچالش موشها با انگل توکسوپلاسما گوندی در مقایسه با گروه کنترل نشان می داد(14و7). Zhouyong و Zhou Yongan وهمکاران با استفاده از واکسنهای مولکولی آنتی ژن SAG3 درموشها ایجاد پاسخهای ایمنی همورال وسلولی ازجمله IgG وIFN-γ ودیگر سیتوکینها را گزارش کرده اند . ولی مقالات کاملی دراین گزارش Zhouyong وZhou Yongan ارائه نشده است (15) .ایمونیزه کردن پروفیلاکتیک بایستی دارای سه هدف باشد 1- پیشگیری از عفونت با کمترین علائم کلینیکی در انسانها 2- پیشگیری ازعفونت درحیوانات به منظور جلوگیری ازعفونت به انسان 3- ایمونیزه کردن گربه های اهلی جهت حذف سیکل زئونوتیک آن به منظور پیشگیری از آلودگی محیط بوسیله اووسیستها. یک واکسن نوترکیب موثر برعلیه هم مرحله جنسی وغیر جنسی انگل بایستی قادر باشد که همه این سه مرحله را پوشش دهد . علی رغم سالها تحقیقی که انجام شده ولی هنوز باید کارهای زیادی انجام شود تا واکسنهای موثر بر علیه انگل ساخته شود .دراین تحقیق نتایج حا صل ازآنالیز تعیین توالی ژن SAG3 توکسوپلاسما گونده ای در پلاسمید pBluescript با استفاده از سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast نشان داد که قطعه 1158جفت بازی در این پلاسمید کلون شده است .و هیچ اینترونی در ژن مورد نظروجود ندارد .همچنین این ژن با ژن SAG3 سویهCEP توکسوپلاسما گونده ای دارای شماره AF340229، سویه RH با شماره AF340227 وسویه P-Br با شماره AY187280 در بانک ژنی به ترتیب حدود 99درصد ، 99درصد و98درصد تشابه داشت واین شباهت نشان دهنده حفظ توالی ژن درسویه های مختلف توکسوپلاسما گونده ای است . درروش برش آنزیمی قطعه 1158 جفت بازی جداشد که هم اندازه ژن SAG3 توکسوپلاسما گونده ای بوده ودرحقیقت ساب کلون این ژن را در پلاسمید pcDNA3 تایید می کرد. نتایج حاصل از PCR پلاسمید pBSAG3 وpcSAG3 نشان داد ، تنها ژن SAG3 تکثیر شده وهیچ ژن دیگری تکثیر نشده است . این نتایج تایید کننده اختصاصی عمل کردن آغازگرهای(پرایمرها) طراحی شده می باشد. نتایج بدست آمده ازاین تحقیق، بیانگر کلون شدن موفق ژن SAG3 درپلاسمیدها ی pBluescript و pcDNA3 است . نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد ، می توان با استفاده ازپلاسمیدهای نوترکیب برای تهیه واکسن علیه بیماریهای انگلی در آینده امیدوار بود به منظور اینکه ژنSAG3 در سلول یوکاریوت مانند عضلات موش قابلیت بیان پیدا کند ودر آینده بتوان از آن برای بررسی ایمنی زایی استفاده کرد ، کلون کردن ژنSAG3 در یک پلاسمید یوکاریوت اهمیت دارد. در این مطالعه برای در دسترس بودن آنتی ژن اختصاصی مراحلی از زندگی انگل ژنSAG3 (P43) سطحی تاکی زوییت،برادی زوییت واسپوروزوییت انگل توکسوپلاسما گونده ای بعنوان یک پروتیین نوترکیب در پلاسمید بیانی یوکاریوتی pcDNA3 کلون گردید تا جهت بررسیهای بعدی برای تهیه پروتیینها وواکسنهای نوترکیب به تنهایی ویا همراه با دیگر آنتی ژنها برای تولید کیتهای تشخیصی و پیشگیری ازبیماری توکسوپلاسموزیس مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به این موضوع ژنSAG3 (P43) رامی توان بعنوان یک عامل بالقوه آنتی ژنی وکاندیدایی برای تهیه واکسن های مولکولی مورد توجه قرار داد. ودرتشخیص ویا پیشگیری از ابتلا به انگل توکسوپلاسما گونده ای در انسان مورد استفاده قرار داد . در ادامه کارما قصد داریم که ازآن بعنوان واکسن نوترکیب جهت ایمنی زایی آن در حیوانات آزمایشگاهی به تنهایی و همراه با دیگر آنتی ژنهای انگل توکسوپلاسما گونده ای مورد بررسی وتجزیه وتحلیل قرار دهیم .

نتیجه گیری

در این مطالعه ژن کامل SAG3 (P43) توکسوپلاسما گونده ای بعنوان آنتی ژن سطحی تاکی زوییت،برادی زوییت واسپوروزوییت این انگل دروکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3 با موفقیت کلون شده ومورد تایید قرار گرفت. لذا می توان ازآن بعنوان ابزار بالقوه ای درتشخیص وپیشگیری از ابتلا به عفونت توکسوپلاسما گونده ای به تنهایی ویا همراه با دیگر آنتی ژنهای انگل درانسان مورد استفاده قرار داد.

تشکر وقدردانی

مطالب این مقاله مربوط به بخشی از پایان نامه دوره دکتری انگل شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است وتمامی اعتبارات آن را دانشگاه مذکور تامین کرده است. بنابراین ازتمامی کسانی که اینجانب را یاری کرده اند بخصوص اعضای محترم گروه انگل شناسی پزشکی تربیت مدرس وشهید بهشتی ومرکزسلولی ومولکولی شهید بهشتی، معاونت محترم پژوهشی دانشکده پزشکی ومعاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس کمال تشکر وقدردانی رابه عمل می آورم .

REFERENCES

1.Frankel, J.K., J.P. Dubey and N.L. Miller. Toxoplasma gondii in cats: Fecal stages identified as coccidian oocyst. Science.1970; 167: 893-896.

2.Guerina, N.G.. Congenital infectionwith Toxoplasma gondii. Pediatric Ann .1994; 23: 138-142,147-151.

3**.** Dubey.JP,Beattie.CP..Toxoplasmosis of animals and man.Boca Raton,Fla:CRC Press. 1988;p:220

4.Caber.MC,Remington.JS. Toxoplasmosis:Thetimehascome.Natl.English.j.med.1988; 318: 313-315.

5. Jongert.E,Robert.CW,Gargano.N,Wald.EF,Petersen.E..Vaccines against Toxoplasma gondii:Challenges and Opportunities.Mem inst Oswaldo Cruz,Rio de Janeiro.2009; 104(2):252-266.

6. Ke-Yi L,Dian-Bo Z,Qing-Kuan W,Jin L,Gui-ping L,Jin-Zhi Y..Biological role of surface toxoplasma gondii antigen in development of vaccine.World Journal of Gastroenterology. 2006;12(15):2363-2368.

7.Young-Ha.L,Dae-Whan.S,Jae-Ho L,Ho-Woo N,Myoung-Hee A . Vaccination against murine toxoplasmosis using recombinant Toxopllasma gondii SAG3 antigen alone or in combination with QuilA.Yonsei Medical Journal2007; 48(3):396-404.

8.Radke JR,Gubbels M.J,Jerome ME, Radke JB,Striepen B,White MW. Identification of a sporozoite-specific member of the toxoplasma SAG superfamily via genetic.Molecular Microbiology. 2004;52(1):93-105.

9.Sambrook.J,Fritsch EF,MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual, Second Edition. Plainview. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

10. Seyed Tabaei J. Preparation of DNA vaccine against SAG1 and HSP70 antigens of Toxoplasma gondii and study on its protective effect in laboratory mice. Tarbiat Modares University; 2008. (Text in Persian).

11. Gazzinelli RT,Hakim FT,Hieny S,Shearer GM,Sher A . Synergistic role of CD4 T Lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated Toxoplasma gondii vaccine.J.Immunol. 1991;146:286-292.

12.JacquetA,Coulon L,Neve JD,Daminet V, Haumont M, Garcia L, etal. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of Toxoplasma gondii to cell-surface proteoglycans.Molecular&Biochemical Parasitology. 2001;116:35-44.

13.Dzierszinski.F,Mortuaire M,Cesbron-Delauw F,Tomavo S. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3gene in Toxoplasma gondii decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice.Molecular Microbiology.2000; 37(3):574-582.

14. Caetano BC,Romero OB,Fux B,Mendes EA,Penido M,Gazzinelli RT.. Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of toxoplasma gondii induces immune response and protection against infection in mice.Human Gene Therapy2006; 17:415-426

15. Yongan Z,Yu XB,Haifeng C,Huanqin Z,Guorong Y,Road WZ. Induction of immune responses in mice by the combined use of the recombinant plasmid encoding the surface antigen SAG3 of toxoplasma gondii and the IL-2 gene adjuvant.Chinese Journal of Zoonoses. 2005;Volume 11 of 21.