بیان ژن کامل آنتی ژن سطحی SAG3 توکسوپلاسما گوندی در سلول یوکاریوتی

حسین ثباتی[۱]، عبدالحسین دلیمی[۲*]، بهرام کاظمی[۳]، فاطمه غفاری فر[۲]

۱. دانشجوی دکتری رشته انگل شناسی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۲. انگل شناس، استاد گروه انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳. انگل شناس، استاد گروه انگل شناسی ومرکز سلولی ومولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

* **نشانی برای مکاتبه:** گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، ص . پ : ۱۱۱-۱۴۱۱۵ تهران، تلفن : ۸۲۸۸۳۸۳۸، dalimi_a@modares.ac.ir

دریافت مقاله: آذر نود پذیرش برای چاپ: بهمن نود

چکیده

سابقه وهدف: *توکسوپلاسما گوند ی یک انگل داخل سلولی اجباری است که مسئول بیماری توکسوپلاسموزیس درانسان وحیوانات بوده ودارای انتشارجهانی است. SAG3 یک آنتی ژن سطحی بزرگ انگل است که در اتصال وحمله به سلولهای هدف میزبان نقش مهمی را ایفاء می نماید. آنتی ژن SAG3 در مراحل مختلف سیکل زندگی انگل ازجمله تاکی زوییت ، برادی زوییت و اسپوروزوییت بیان می شود . هدف این مطالعه بیان ژن کد کننده کامل پروتیین SAG3 توکسوپلاسما گوندی درسلولهای CHO بوده است.*

روش کار: *در این مطالعه ژن کامل SAG3 پس از تکثیر به روش PCR درپلاسمید pBluescript کلون شد. سپس در پلاسمید بیانی یوکاریوتی pcDNA3 که با آنزیمهای HindIII , BamHI برش خورده بود، ساب کلون(Subclone) گردید. این پلاسمید نوترکیب pcSAG3 به سلولهای CHO جهت بیان ژن کامل SAG3 ترانسفکت شد. بیان پروتئین با روش RT-PCR، SDS-PAGE وWestern blot تایید گردید.*

یافته ها : *پلاسمیدهای نوترکیب pcSAG3استخراج شده با روش های PCR وبرش آنزیمی و توالی یابی(Sequencing) تایید ونتایج نشان داد که قطعه SAG3 در پلاسمید pcDNA3 کلون شده است وباند حدود ۱۱۵۸جفت بازی روی ژل آگاروز ایجاد شده بود که هم اندازه ژن SAG3 توکسوپلاسما گوند ی است. نتایج RNA وعصاره پروتئینی استخراج شده ازسلول های ترانسفکت شده با pcSAG3 یک باند۱۱۵۸جفت بازی با روش RT-PCR ویک باندحدود ۴۳KDa با روش Western blot رانشان داد.*

نتیجه گیری: *نتایج نشان داد که کلون ژن کامل SAG3 در پلاسمید بیانی pcDNA3 وبیان آن درسلولهای یوکاریوتیک با موفقیت انجام شده است . ازاین پلاسمید نوترکیب می توان بعنوان ابزار بالقوه ای در تهیه DNA واکسن جهت پیشگیری از ابتلا به عفونت توکسوپلاسما گوندی و یا تهیه کیت تشخیصی استفاده نمود.*

واژگان کلیدی: ***توکسوپلاسما گوندی، SAG3 ، کلونینگ، بیان ، سلول یوکاریوتیک***

مقدمه

انگل توکسوپلاسما گوندی دربین انسانها وحیوانات سرتاسر دنیا وجود داشته وبیماری ایجاد شده توسط این انگل توکسوپلاسموزیس نامیده می شود(۱). این انگل سبب بروز مشکلا تی، ازجمله انسفالیت کشنده تا سقط جنین،تولد جنینهای غیر طبیعی وتولد زود هنگام، درافراد دارای نقص ایمنی ازجمله بیماران مبتلا به HIV وزنان باردار می شود (۲). در حیوانات از جمله دام ها ی روستایی توکسوپلاسموزیس دارای اهمیت اقتصادی زیادی در سرتاسر دنیا است . از طرفی کیست های بافتی توکسوپلاسما گوندی موجود درگوشت دام های آلوده منشاء مهم عفونت برای انسان هستند. عفونت طبیعی بااین انگل منجربه ایمنی محافظتی طولانی مدت غیراسترایل می شود که سلول های $CD4^+$و $CD8^+$درآن دخالت دارند(۳). بنابراین واکسن های نوترکیب و پروتئینی تهیه شده برعلیه توکسوپلاسموزیس بایستی براساس آنتی ژن هایی ازانگل که تولید ایمنی محافظتی وابسته به این سلول ها را می کنند تولید گردد. بیشترین و مهمترین نوع آنتی ژنهای توکسوپلاسما، آنتی ژنهای سطحی وترشحی انگل هستند(۴). متا سفانه واکسن ها وداروهای موثری برای کنترل وبهبود توکسوپلاسموزیس وجود ندارد. فقط واکسن زنده کاهش حدت یافته شده تا کی زوییت مورداستفاده قرارگرفته است. معذلک این واکسن ها، به علت اثرات جانبی ،زمان ماندگاری کم وقیمت بالا، به طور گسترده ای پذیرفته نشده است. ازطرفی واکسن های زنده احتمال ابتلا زیاد انسان به عفونت را با خود به همراه دارند. واکسن های مولکولی ، نوع جدید واکسن هایی با توان ایجاد ایمنی وابسته به سیستم ایمنی سلولی و هومورال در قرن بیستم می باشند. بنابراین در حال حاضر توسعه وبهره برداری از واکسن های مولکولی توکسوپلاسما گوندی بعنوان یک هدف مهم وبااهمیت برای کنترل موثر توکسوپلاسموزیس در آمده است.

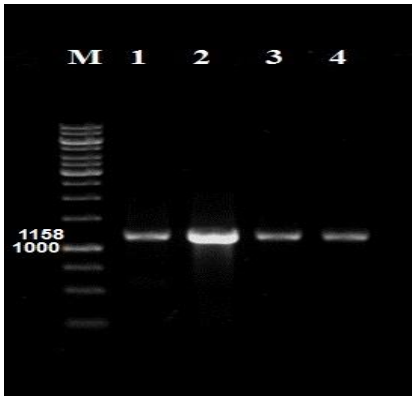
اخیرا توجه اصلی معطوف به مولکول های سطحی پارازیت می باشد. سطح انگل با آنتی ژنهایی که به GPI (گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول) متصل می باشد پوشیده شده که به عنوان SAG (آنتی ژنهای سطحی) شناخته شده است(۵). بعضی ازاین مولکولهای اختصاصی، مراحلی از سیکل زندگی انگل بوده بطوریکه SAG1(30KDa)،SAG2(22KDa) و SRS3 پروتیین های هستند که فقط در سطح تاکی زوییت ها بوده ودر سطح برادی زوییتها نیستند. درحالیکه پروتیین های دیگر مانند SAG3(43KDa)و23KDa هم درسطح تاکی زوییت ها وهم برادی زوییت ها وجود دارند(۶). اخیرا مشخص شده که SAG3 روی سطح اسپروزوییت ها هم وجود دارد(۷). آنتی ژن های سطحی توکسوپلاسما گوندی نقش مهمی دراتصال، علامت دهی،تهاجم، انتقال و واکنش با سیستم ایمنی میزبان بازی می کنند(۸) . نماینده آنتی ژن های بزرگ سطحی، تاکی زوییت های توکسوپلاسما گوند ی SAG3, SAG1,SAG2می باشند(۸) . ایمونیزاسیون با SAG1 ایمنی محافظت کننده ای را برعلیه عفونت کشنده درموش ها ایجاد می کند. SAG3 خیلی شبیه به SAG1 در ساختمان و وظایف وکارکرد می باشد(۸). این دو پروتیین نشان داده اند که در تهاجم واتصال به سلول نقش دارند. ونقش اصلی اتصال به سلول را SAG3 به عهده دارد(۹) . معذلک مطالعات کمی در مورد SAG3 تاکنون انجام شده است. ژن کامل SAG3 حدود bp ۱۱۵۸ است ویک پلی پپتید ۳۵۹آمینواسیدی را کد نموده وپروتئین تولیدشده توسط آن هم حدود KDa ۴۳ وزن دارد(۹). بیشتر مطالعات هم درباره کلون نمودن وبیان ژنهای پروتیین های سطحی توکسوپلاسما انجام شده است . علی رغم سالها تحقیق، هنوز باید کارهای زیادی انجام شود تا واکسنهای موثر بر علیه انگل ساخته شود. در مطالعه حاضر، بیان ژن کامل SAG3 درسلولهای CHO به عنوان واکسن مولکولی نوترکیب جهت تولید پروتئین درداخل سلول هدف اصلی می باشد. ازاین پلاسمید نوترکیب می توان جهت تهیه واکسن های پروتئینی ونوترکیب مولکولی برعلیه توکسوپلاسموزیس و یا ساخت کیت های تشخیصی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس استفاده نمود .

روش کا ر

برای تکثیرانگل توکسوپلاسما سوش RH به هر موش ۰/۵ سی سی مایع صفاقی حاوی ۲×۱۰^{۵} تاکی زوییت زنده به طور داخل صفاقی تلقیح شد وپس از گذ شت ۴ روز ، مایع صفاقی موش های آلوده به وسیله سرنگ جمع آوری شد. سپس حدود ۱۰۰ میکرولیتر(۵×۱۰^{۷}) از تاکی زوئیت های تغلیظ شده وشستشو شده با بافر PBS داخل ویال ۱/۵سی سی ریخته شد وبا روش فنل کلروفرم DNA آن استخراج شده وتا مراحل بعدی در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید(۱۰). یک جفت پرایمر با جایگاه برش آنزیمی BamHI,HindIII برای ژن کامل SAG3 طبق روش گفته شده طراحی وازشرکت سیناژن تهیه گردید(۱۱). قطعه SAG3 با روش PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده توسط دستگاه ترموسایکلر که دمای Annealing وکلیه مراحل کاردرآن Setup شده بود در ۳۰سیکل تکثیر گردید. قطعه bp SAG3۱۱۵۸ پس از الکتروفورزوتخلیص ازژل باکیت Fermentas در وکتور (T-Vector) pBluescript کلون گشته وبه باکتری های پذ یرنده پلاسمید(Competent cell) انتقال گردید. باکتری های سفید رشد کرده روی محیط LB آگارحاوی آمپی سیلین و Xgal و IPTG با تست Rusconis جهت جداسازی وتعیین کلنی های حاوی پلاسمید نوترکیب احتمالی pBSAG3 مورد آزمایش قرار گرفت . باکتری های حاوی پلاسمید نوترکیب احتمالی pBSAG3 درمحیط LB مایع حاوی آمپی سیلین کشت وشبانه درانکوباتور شیکردار جهت تکثیر باکتریها قرار گرفت. پلاسمیدهای نوترکیب از باکتری ها با کیت تخلیص Bioneer تخلیص گردید. وجود ژن کامل SAG3 در پلاسمید های تخلیص شده با روش PCR، برش آنزیمی دوسر قطعه و Sequencing تایید شد. قطعه SAG3 باآنزیم دوسریعنی BamHI,HindIII از pBSAG3 خارج وازژل تخلیص وبه داخل وکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3 که با آنزیمهای دوسربرش وخطی شده بود ساب کلون (Subclone) گردید(۱۱). باکتری های رشدکرده روی محیط LB آگارحاوی آمپی سیلین دارای پلاسمید نوترکیب احتمالی(pcSAG3) با تست Rusconis تایید شد(۱۲) .سپس در محیط LB مایع حاوی آمپی سیلین بطور شبانه کشت وپلاسمیدها با کیت تخلیص Bioneer از باکتری ها تخلیص گردید. وجود قطعه SAG3 درپلاسمید نوترکیبpcSAG3 با روش PCR، برش آنزیمی دوسر قطعه و Sequencing تایید شد . پلاسمید های خالص شده pcSAG3 جهت ترانسفکت به داخل سلولهای یوکاریوتی CHO مورد استفاده قرار گرفت. سلولهای CHO درپلیتهای دارای چاهکهای ۳۵میلیمتری حاوی محیط DMEM(شرکت Gibco) و۱٪ پنی سیلین واستریتومایسین و۱۰٪ سرم FCS درانکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵٪ CO2 تاحدود ۷۰-۶۰٪ رشد نمودند. سلولها با محیط DMEM فاقد سرم شستشوشده و سپس با استفاده از کیت ترانسفکشن (Novagene,USA Genejuice Transfection reagent kit) برطبق دستورالعمل آن باpcSAG3 ترانسفکت گردید. سلولهای CHO ترانسفکت شده با pcSAG3 وسلولهای غیر ترانسفکت شده (گروه کنترل) پس از ۴۸و۷۲ ساعت جمع آوری گردید . سلولهای دوتاازچاهک ها بامحلول RNX-Plus Solution شرکت سیناژن طبق دستورالعمل آن ترکیب شد تا RNA موجود درسلولها استخراج گردد. سپس با محلول DNase (Fermentas) طبق دستورالعمل گفته شده آن را عاری از DNA نموده وبا کیت RT PreMix شرکت Bioneer طبق دستورالعمل کیت با پرایمر oligodt و یا Reverse اختصاصی طراحی شده دربالا تبدیل به cDNAنموده وآنها را PCR کردیم . نمونه های PCR شده درکنارنمونه RNA، DNase شده و RNA، DNase نشده و RNA سلول های چاهک غیرترانسفکت شده بعنوان کنترل روی ژل آگاروز الکتروفورز گردید. سلولهای CHO ترانسفکت شده باpcSAG3 بقیه چاهکها وسلولهای غیر ترانسفکت شده (گروه کنترل) پس از ۴۸و۷۲ ساعت جمع آوری وبا بافر نمونه لیز شدند. بعداز سونیکاسیون، سلولها با سانتریفوژ رسوب داده شد وپروتئین خطی شده آنها روی ژل ۱۲/۵٪ SDS-PAGE با روش ارائه شده بوسیله Laemmli مشاهده گردید(۱۳). سپس پروتئین ها به غشاء نیتروسلولزی منتقل گشت. نوارهای غشایی با BSA-PBST20%1 بطور شبانه بلوکه شده وسپس به ترتیب با رقتهای مختلف سرم انسانی دارای آنتی بادی مثبت توکسوپلاسمایی(تیتر بالای $IgM4^{+}$ مشخص شده با IgM-ELISA) به همراه آنتی بادی ضد IgM انسانی کونژوکه شده با پراکسیداز(DAKO,Denmark) که در BSA-PBST20%1رقیق شده بود(رقت ۱/۲۰۰و۱/۲۰۰۰) آغشته گردید(۱۴). باندهای اختصاصی با دی آمینو بنزیدین(DAB) (DAKO,Denmark) آشکارگردید.

یافته ها

نتایج حاصل از واکنش PCR از DNA استخراج شده از انگل روی ژل آگاروز یک باند bp ۱۱۵۸را نشان داد (شکل ۱). پس ازتایید نهایی کلونینگ ژن SAG3 درپلاسمیدpcDNA3جهت تعیین ترادف برای پیشگیری از هرگونه آلودگی، پلاسمیدهای موجود درکلونی های سفید با کیت شرکت بیونر(Bioneer) آلمان استخراج وبرای تعیین توالی به شرکت ژن فن آوران ارسال وپس ازانجام آن به کمک سایت اینترنتی www.ncbi.nlm.nih.gov/blast از نظر تشابهات واختلافات با ژن SAG3 سویه RH توکسوپلاسما گوندی مقایسه شد (شکل۲).
نتایج ترادف (Sequencing) ژن کامل کلون شده در pcDNA3 نشان داد که قطعه ۱۱۵۸ جفت بازی در این پلاسمید کلون شده‌است و ژن کلون شده، ژن SAG3 توکسوپلاسما گوندی است. این سویه با سویه RH بانک ژنی با شماره دسترسی AF340227 وHM585285 ،۹۹٪ وسویهCEPبا شماره دسترسی AF340229 ، ٪۹۹ وسویه P-Brبا شماره AY187280 ٪۹۸درصد شباهت دارد .ترادف جدید بدست آمده ازژن کامل SAG3 درتحقیق انجام شده دربانک ژنی(Genbank)به شماره دستیابی JF312642 به ثبت رسید.

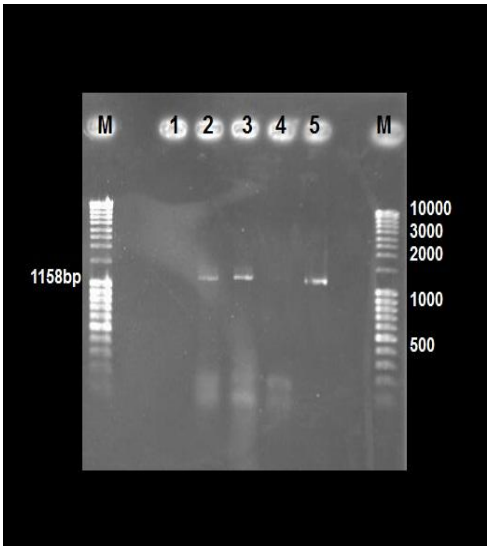


شکل ۱.الکتروفورز محصول PCR ژن SAG3 توکسوپلاسماگوندی با آغازگرهای اختصاصی روی ژل آگارز ۱ درصد؛ ستون ۱ و ۲ و ۳ و ۴: محصول PCR (قطعه ۱۱۵۸ جفت بازی ژن SAG3)، ستون M: نشانگر ۱ کیلوجفت بازی

atgcagctgt ggcggcgcag agcagcaggt cccgcgagcc tggggaagca gtctttgccg
ctcgggtgtt ttttcgcggc ttttggtttg tgcgtgttgt
ctgcgatcttgggaaccgga gagcacggac tgttcgtcgc
cgcaggtaaa tcgagaagta agataactta ttttggcacg ctcactcaga
aggctccgaa ctggtaccgc tgctcttcaa cgagggcgaa
agaagaggtc
gtaggacatg tgacgctgaa caaagagcac cctgatatga caattgaatg
cgtcgacgac ggcttgggcg gagagttttt gccgctcgaa
ggcgcgacgt cgtcgtaccc gcgagtatgt cacattgatg
ccaaggacaa gggcgactgc gagcgcaaca agggctttct
gaccgactac ataccgggcg cgaagcagta ctggtacaag
atagaaaagg tggagaacaa cggcgagcaa tccgttctgt
acaaattcac agttccttgg atattccttc cgcccgccaa gcagcgatac
aaggttggat gccgataccc gaaccacgag tattgctttg ttgaggccac
cgtcgaaccc acgccgccaa tggtcgaagg caagagagtg
acctgcgggt accccgagtc cggccccgtg aatctcgagg
tggacttgtc aaaggacgcg aactttatcg agattcggtg cggcgaacag
caccacccgc agccgtcgac ctacacgctg cagtactgct
caggtgactc ggtggacccg cagaagtgtt cgccgcagtc
cctgacgaac atttttatg actacagctc ttcgtggtgg aaggggaaac
tgaacgggcc tgacggggca actctcacca ttccacccgg
cgggttcccc
gaagaagaca aatcttttct tgtcgggtgt tcactcactg tggacgggcc
gcccttctgc
aacgtcaaag tgagagttgc cgggaacccc agaaagtggg
ggagaggcgg aggcggccat
ccaggaagcg gaggatcgca gccggaaact gacggggaaa
ctcaagctgg aacagaaagt tcagccggcg cgagttcgcg
aatggcttcc gttgccctgg cgttccttct cggtctcctt gtgcatgtgg
ctgcctaa

شکل۲. توالی ژن SAG3کلون شده درپلاسمیدpcDNA3

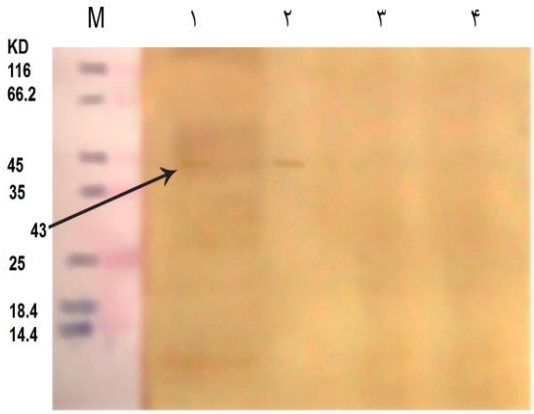
محصول سنتز شده پلاسمید نوترکیب pcSAG3 در سلولهای CHO با روش RT-PCR و SDS-PAGE ووسترن بلا ت مورد بررسی قرارگرفت. الکتروفورز محصول RT-PCR باRNAاستخراج شده ازسلول های چاهک های ترانسفکت شده با پلاسمید نوترکیب pcSAG3 (۴۸و۷۲ساعت) یک باند ۱۱۵۸bpراروی ژل آگاروزیک درصدنشان داد. درحالی که الکترفورزمحصول RT-PCR باRNAاستخراج شده ازسلول های چاهک غیر ترانسفکت شده و نمونه RNA، DNase شده ، هیچ باندی ایجاد نکرد (شکل ۳). این نتایج نشان دهنده این است که سلولهایCHO باپلاسمیدpcSAG3 ترانسفکت شده و با کمک سیستم رونوشت برداری سلول CHO ،ازروی ژنSAG3 موجود درپلاسمید نوترکیب،mRNA ساخته شده است.این موضوع نشان داد که مراحل ترانسفکت واستخراجRNA به خوبی انجام شده است.



شکل۳.الکترفورزمحصول RT-PCR .ستون ۱نمونه کنترل باRNAکهDNAaseشده،۲و۳محصول RT-PCR(۱۱۵۸bp) به کمکRNAاستخراج شده ازسلولهای ترانسفکت شده، ۴ کنترل با RNA استخراج شده ازسلول غیرترانسفکت شده ۵ کنترل باRNAکهDNAase نشده،Mمارکر۱کیلوجفت بازی

پروتئین‌های تفکیک شده در مرحله SDS-PAGE به کاغذ نیتروسلولزی منتقل شده وهمانطور که دیده می شود در بین پروتئین‌های استخراج شده‌از چاهکهای ترانسفکت شده با پلاسمید pcSAG3 باند پروتئینی با وزن مولکولی حدود ۴۳ کیلودالتون (وزن پروتئین مورد نظر ما نیز ۴۳ کیلو دالتون است) وجود دارد که درچاهک کنترل وجود ندارد. تشکیل این باند در روی کاغذ نیتروسلولز نشان دهنده شناسایی پروتئین SAG3 بوسیله سرم انسانی ضد توکسوپلاسمایی $IgM4^+$ می باشد(شکل ۴).

بررسی با وسترن بلا ت نشان داد که پروتئین ها ی تولید شده در سلولهای CHO توسط ترانسفکشن با pcSAG3 دارای وزن مولکولی مورد انتظار بوده وبا آنتی بادی های پلی کلونال اختصاصی شناخته شدند . درصورتی که هیچگونه پروتئین توکسوپلاسما در سلولهای گروه کنترل (غیر ترانسفکت شده) تشخیص داده نشد .



شکل ۴.نوارهای نیتروسلولز بدست آمده‌از روش وسترن بلات باپروتئین سلول‌های CHO ترانسفکت شده وکنترل:ستون ۱و۲ پروتئین‌های سلول‌های CHO ترانسفکت شده با pcSAG3 که در ناحیه وزنی ۴۵ – ۳۵ کیلودالتون باند مشاهده می شود، ستون۳سلول های CHO ترانسفکت نشده(کنترل منفی)،ستون۴ ستون سلول‌های CHO ترانسفکت شده با pcDNA3 (کنترل منفی)، ستون M مارکر به ترتیب از پایین به بالا KDa ۱۴/۴ ،۳۵،۴۵،۱۸،۲۵/۴ ، ۶۶/۲، ۱۱۶

بحث

توکسوپلاسما گوندی یک انگل داخل سلولی اجباری است که دارای سیکل زندگی پیچیده ای است. سیکل جنسی وغیر جنسی آن درسلول های اپیتلیال روده گربه وبافت های حیوانات وپرندگان می باشد(۱۵). این انگل تقریبا به همه سلول های غیر هسته دار میزبان حمله می کند.

توکسوپلاسما گوندی موجب بروز خطراتی درجنین می شود . بیشترین تاثیرات خطرناک توکسوپلاسموز مادرزادی بعضی مواقع سقط جنین وتولد زود هنگام جنین می باشد (۱۵). عفونت مادرزادی بر طبق شدت وتنوع ارگان های آلوده علائم مختلفی دارد. اکنون مشخص شده که حیوانات وافراد عفونت یافته به فرم مزمن دارای ایمنی محافظتی طولانی مدتی برعلیه بیماری می باشند و پاسخ های ایمنی موثر، بوسیله T-Cell نوع $CD4^+$ و $CD8^+$ که درارتباط با تولید گاما انترفرون می باشند تولید می شود(۳). درحا ل حاضر یک واکسن زنده براساس سوش های تخفیف حدت یافته توکسوپلاسما گوندی درحیوانات اهلی بکار گرفته شده است.

معذلک همه واکسن ها برای میزبان بعلت فعالیت دوباره واحتما ل تبدیل شدن به فرم بیماری زا مناسب نمی باشد. به این دلیل استفاده از تکنولوژی های نوترکیب وکلون وبیان ژن های مفید بعنوان یک ابزار جالب و بالقوه برای توسعه واکسن ضروری ولازم می باشد. براین اساس جهت توسعه یک واکسن نوترکیب تمرکز روی بیان ژن کامل SAG3 درسلولهای یوکاریوتیک ضروری است. زیرا مطالعات قبلی برای پیشگیری ازتوکسوپلاسموزیس نشان داده که ایمونیزه کردن با پروتئین ها یا واکسن نوترکیب می تواند ایجاد پاسخ های ایمنی رانموده که قادر است میزان مرگ ومیر وسطح کیست های بافتی در حیوانات عفونت یافته با توکسوپلاسما را کاهش داده ولی هنوز لازم است که کارایی آن افزایش یابد. این انگل در انسان فقط با تست های سرولوژیک تشخیص داده می شود و لذا آنتی ژنهای خاص ومعین درسیستم تشخیص آن بسیار ضروری است . درضمن بررسی ها نشان داده که واکسن های تولید شده برعلیه آنتی ژن هایی از توکسوپلاسما گوندی که در طی مراحل مختلف زندگی انگل بیان می شود می تواند محافظت بهتری رادر پیشگیری از عفونت ایجاد نماید(۱۶). در مطالعه حاضر ژن آنتی ژن سطحی SAG3 توکسوپلاسما گوندی درسلول های CHO بیان سپس با RT- PCR ,SDS-PAGE و Western blot تایید شد. طبق نتایج وزن مولکولی SAG3 ۴۳کیلودالتون است این آنتی ژن می تواند از DNA ژنومی سه مرحله انگل بیان شود. پروتیین کامل SAG3 شامل یک پلی پپتید ۳۵۹اسید آمینه ای است که حدود ۱۱۵۸bp می باشد(۹). در ضمن مشخص شده که آنتی ژن SAG3 یکی از اجزای پروتیینی سطح سلول انگل بوده وروی سطح تاکی زوییت،برادی زوییت واسپوروزوییت انگل توکسوپلاسما گوند ی وجود داشته ودرهرسه مرحله بیان می گردد(۷). این آنتی ژن یکی از اعضای سیستم رسپتوری توکسوپلاسما گوندی است که به GPI(گلیکوزیل،فسفاتیدیل اینوزیتول) سطحی سلول متصل بوده و بعنوان گیرنده واسطه ای سلولهای میزبان عمل می کند. Jacquetوهمکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که آنتی ژن سطحی SAG3 واسطه اتصال توکسوپلاسما گوندی به پروتئوگلیکان های سطحی (هپاران سولفات پروتئوگلیکان HSPGs) سلول های هدف مانند CHO بوده وموجب تهاجم وورود انگل به سلول میزبان می شود(۹). ونقش اصلی اتصال به سلول را SAG3 به عهده دارد. با بلوکه نمودن گیرنده های SAG3 روی سلول با مواد محلول گلیکوگونجوکیت شده ویابا آنتی بادی های ضد SAG3 دیده شد که تهاجم انگل به سلول بسیار کاهش می یابد. آنها مشاهده کردند که سلولهای CHO راکه بامقدارمتنوعی از SAG3 نوترکیب(recSAG3) انکوبه می کنند موجب کاهش جذب تاکی زوئیتها تامیزان ۷۰٪به این سلولها می شود. درضمن میزان ۵۰تا۶۰٪ کاهش دربانددشدن تاکی زوئیتهای فاقد SAG3به سلولها مشاهده گردید.این نتایج تعیین کرد که SAG3اولین پروتئین باندشونده به گلیکوآمینوگلیکانها مرتبط با توکسوپلاسما است و در واکنشهای بین SAG3-HSPGs دراتصال انگل به سلولهای هدف دخالت دارند.

Congوهمکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که دوپپتیدFLTDYIPGAوFLLGLLVHVمشتق شده از SAG3 به عنوان اپی توپها موجب تولید IFN-γ از تی سلهای +CD8می شوند.آنها با روشHLA-bindingنشان دادند که این دوپپتید دارای افینیتی خوبی جهت باند شدن به HLA-A*0201 می باشند. آنها نشان دادند که نه تنها برای آللهای HLA-A*0201 دارای افینیتی بالایی می باشند بلکه به سه یا چهارتا ازدیگر آللهای HLA-A02 به خوبی متصل می شوند(۱۷).

Caetano وهمکاران (۲۰۰۶) قسمتی ازاین آنتی ژن رابا آدنوویروسهای کدکننده آن درسلولهای HEK 293 به مقدارزیادی تولیدنموده وبا روش وسترن بلات تاییدنمودند. آنها نشان دادندکه این آنتی ژن به همراه دو آنتی ژنSAG1وSAG2 درموشها تولید پاسخهای ایمنی ازنوع Th1نموده و تا۸۰٪ کیستهای مغزی را کاهش می دهد(۱۸).

Dzierszinski وهمکاران (۲۰۰۰) قسمتی ازاین آنتی ژن راجهت تولید پروتئین ونقش آن دراتصال به سلول درانگل های دارای این آنتی ژن ویا فاقد آن را مورد بررسی قرارداده و مشاهده کردند که انگلهای فاقد این آنتی ژن بیان این پروتئین را ازدست داده ومیزا ن تهاجم به سلول میزبان را ۵۰ تا ۶۰ ٪ کاهش می دهد. آنها نشان دادندکه این آنتی ژن یکی از گیرنده های توکسوپلاسما گوندی بوده که به مانند یک لیگاند عمل کرده ومنجربه شناخت سلول واتصال به آن می شود(۱۹).

Leeوهمکاران (۲۰۰۷) جهت بررسی ایمنی زایی آنتی ژن فیوژشده باGST(Glutathione-S-transferase) درموشهای BALB/c آن را درسیستمهای پروکاریوتی بیان وتاییدنمودند.همچنین آنها جهت تولید mRNA سیتوکینها درطحال با روش RT-PCR آن را مورد بررسی قراردادند.آنها نشان دادند که mRNA تولیدکننده IFN-γ ونیتریک اکسید افزایش معنی داری داشته وبیشترین آنتی بادی IgG ، IgG1 و IgG2a درمقایسه با گروه شاهد تولید شده بود. علاوه بر این نتایج بعدازچالش با انگل توکسوپلاسما ی سوش Me49 در موشها ی ایمونیزه شده با آنتی ژن نوترکیب وگروه شاهد بیشترین زمان زنده بودن وکمترین کیستهای مغزی را درمقایسه باگروه شاهد نشان داد(۸).

اختلاف مهم بین مطالعه حاضر ودیگر مطالعات(۹-۷) این است که در این مطالعه ژن کامل SAG3 در pcDNA3 کلون گردید. لذا بعلت اخذ نتایج بهتر بنظر می رسد این پلاسمید بیانی نوترکیب جهت تهیه واکسن برعلیه توکسوپلاسموزیس مفیدتر است. اهمیت مهم دیگراینکه این پلاسمیدبیانی حاوی ژن کامل SAG3را به سلولهای CHO ترانسفکت نموده ولی دیگران قسمتی از ژن را با وکتورهای دیگری موردبررسی قرارداده اند. نتایج این مطالعه نشان دادکه بطورموفقیت آمیزی ژن کامل SAG3 درپلاسمید بیانی pcDNA3 کلون ودرسلولهای یوکاریوتی بیان گردید. ازاین SAG3 بیان شده بعنوان کاندیدایی جهت تهیه واکسنهای نوترکیب وتولید کیتهای تشخیصی برای ارزیابی پاسخهای ایمنی برعلیه توکسوپلاسموزیس می توان استفاده کرد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر ژن کامل SAG3 (P43) توکسوپلاسما گونده ای بعنوان آنتی ژن سطحی تاکی زوییت،برادی زوییت واسپوروزوییت این انگل دروکتور بیانی یوکاریوتی pcDNA3 کلون ودرسلول یوکاریوتی CHOبیان 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 مورد استفاده قرار داد.

REFERENCES

1. Dubey JP,Jones JL. Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the united states. Int J Parasitol.2008;38 : 1257-1278.

2.Guerina NG. Congenital infection with Toxoplasma gondii. Pediatric Pediatr Ann. 1994; 23(3): 138-142,147-151.

3.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.

4.Bhopale GM. Development of a vaccine for toxoplasmosis: Current status. Microbes Infect .2003;5:457-462.

5.Boothroyd JC, Hehl A, Knoll LJ, Manger ID. The surface of toxoplasma:more and less. Int J Parasitol. 1998;28:3-9.

6.Lekutis C, Ferguson DJ, Grigg ME, Camps M, Boothroyd JC. Surface antigen of Toxoplasma gondii: variations on a theme. Int J Parasitol.2001:1-8.

7.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. Mol Microbiol. 2004;52(1):93-105.

8.Lee YH, Shin DW, Lee JH ,Nam HW, Ahn MH.Vaccination against murine toxoplasmosis using recombinant Toxopllasma gondii SAG3 antigen alone or in combination with QuilA. Yonsei Med J. 2007;48(3):396-404.

9. Jacquet.A, Coulon L, Neve J.D, Daminet V, Haumont M, Garcia L, Bollen A, et al. The surface antigen SAG3 mediates the attachment of Toxoplasma gondii to cell-surface proteoglycans. Mol Biochem Parasitol. 2001;116:35-44.

10. Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: A laboratory manual, third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor New york . 2001.

11. Sobati H, Dalimi A, Kazami B, Ghaffarifar F. Production of Molecular clones SAG3(P43) surface antigen of Toxoplasma gondii in Eukaryotic expression vector. Iranian J Inf Dis Trop Med. 2011;16(52):7-13.(Full Text in Persian).

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

13.Laemmili UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature.1970; 227:680-685.

14.Martin V, Arcavi M, Santillan G, Armendoeira MR, De Souza Neves E, Griemberg G. Detection of human toxoplasma-specific imunogolobulins A,M and G with a recombinant toxoplasma gondii ROP2 protein. Clin. Diagn. Lab. Immunol.1998; 5:627-631.

15.Kazemi B, Maghen L, Bandehpour M, Shahabi S, Haghighi A.Gene cloning of P43 surface protein of Toxoplasma gondii Tachyzoite and Bradyzoite. Res J Microbiol. 2007; 2(2):170-174.

16.Jongert E, Roberts CW, Gargano N, Forster-Wald E, Petersen E. Vaccines against Toxoplasma gondii: challenges and opportunities. Mem Inst Oswaldo Cruz,Rio de Janeiro 2009; 104(2): 252-266.

17. Cong H, Mui EJ, Witola WH, Sidney J, Alexander J, Sette A, et al.Towards an immunosense vaccine to prevent Toxoplasmosis:protective Toxoplasma gondii epitopes restricted by HLA-A*0201. Vaccine. 2011; 29:754-762.

18. Caetano BC, Bruna-Romero O, Fux B, Mendes EA, Penido MLO, 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 . Hum gene Ther. 2006; 17:415-426.

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