

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

راضی ناصری فر^۱، فاطمه غفاری فر^{۱*}، عبدالحسین دلیمی اصل^۱، زهره شریفی^۲

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

(۲) گروه ویروس‌شناسی، سازمان انتقال خون

تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۷

تاریخ دریافت: ۹۰/۱/۲۷

چکیده

مقدمه: توکسوبلاسموز یکی از بیماری‌های زئونوز و دارای انتشار وسیع در جهان بوده که اثرات شدید بالینی و دام پزشکی عدیده ای را ایجاد می‌کند. این انگل داخل سلولی باعث عوارض عصبی و بیماری‌های چشمی در افراد دارای ضعف ایمنی و نوزادان متولد از مادران آلوده می‌شود. بروز موارد زیاد بیماری همراه با عوارض شدید و کشنده توکسوبلاسموز ضرورت یافتن واکسن مؤثری برای این بیماری را نشان می‌دهد. یکی از مهم ترین راه‌های 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 راه‌های آلدگی انسان مصرف گوشتش 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 واکسن‌های جدید بر علیه این بیماری ضرورت می‌باشد. ایمن سازی با پلاسمید حاوی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های 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 روش‌ها: 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 آنزیم‌های EcoRI و Hind3 از پلاسمید pTZ57R جدا گردید. در مرحله بعد پلاسمید pcDNA3 برای پذیرش قطعه GRA5 و انجام کلونینگ نیز با آنزیم‌های 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.

یافته‌های پژوهش: به منظور تایید مراحل مختلف کار از روش‌های 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 توکسوبلاسمما 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.

واژه‌های کلیدی: توکسوبلاسمما گوندای، کلونینگ، GRA5، pcDNA3، بیان سلولی، وسترن بلات

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

Email: ghafarif@modares.ac.ir

مقدمه

توکسپلاسموزیس توسط تک یاخته‌ای انگلی به نام توکسپلاسمایوندای (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) توکسپلاسموزیس اثرات متفاوتی در میزان ایجاد می‌کند. در افراد دچار ضعف سیستم ایمنی مثل افراد مبتلا به ایدز، گیرنده‌های پیوند عضو و بیماران سلطانی باعث بیماری‌های شدید و مرگ و میر می‌شود.^(۱۰) این بیماری با کوریورتینیت، کوری، تورم غدد لنفاوی، آسفالیت و یا مرگ همراه است.^(۱۱) توکسپلاسموزیس مادرزادی، که حاصل عبور انگل از جفت در هنگام آلوگی اولیه مادری است، می‌تواند باعث سقط جنین، مرگ جنین در رحم یا نقص‌های شدید مادرزادی نظیر هیدروسفالی، و عقب‌ماندگی ذهنی یا کوریورتینیت گردد.^(۱۲)

توکسپلاسموز 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 ایده‌آل حیوانی دارای منافع متعددی از جمله افزایش قدرت تولید مثل و کاهش خطرات بهداشتی برای مصرف کنندگان گوشت‌های مشکوک می‌باشد. برای مدت ۵۰ سال، آنتی‌ژن‌های خام به عنوان واکسن بر علیه توکسپلاسموز مورد آزمایش قرار گرفته‌اند 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 آنتی‌ژن‌های ایمنوژنیک و بدون اضافه نمودن آنتی‌ژن‌های غیر مرتبط ایجاد کننده پاسخ‌های تبزا همراه با پاسخ ایمنی، باعث تحریک سیستم ایمنی می‌شوند. آنتی‌ژن‌های دارای پاسخ‌های محدود ایمنی را می‌توان با مواد غیر طبیعی تقویت

نمود. این اجزاء به صورت ادجونت‌های (یاور) مناسب بوده و باعث ارتقای کارایی واکسن می‌شود.

معمولاً (SAG1) آنتی‌ژن‌های سطحی تاکی زوئیت به عنوان معمول ترین Ag مورد بررسی هستند که به صورت آنتی‌ژن نوترکیب استفاده شده اند است. کاندیدهای جدید برای ساخت واکسن آنتی‌ژن‌های ROP1، ROP2، GRA1، GRA2، SAG3، SAG2، HSP70، GRA4، GRA5، P24، P54، SRS1 ترشحی یا GRA جزءی از ژن‌های هسته ای بوده و توسط DNA هسته ای کد می‌شوند. از بین آن‌ها GRA5 به عنوان یکی از آنتی‌ژن‌های مهم توکسپلاسمای در مراحل مختلف سیکل زندگی انگل ترشح می‌شود. لازم به ذکر است که این ژن در تست تشخیصی الیزا نیز کاربرد فراوانی دارد و چنانچه با تهیه ژن کامل و استفاده از اجودنت‌های مختلف، خاصیت ایمنی زایی آن بررسی شود، می‌توان به تهیه واکسنی موثر بر علیه توکسپلاسموز 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 برادری زوئیت‌ها و تاکی زوئیت‌ها ترشرح 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 سلول‌های CHO استفاده و با روش SDS-page تایید شد.

مواد و روش‌ها

تکثیر انگل توکسپلاسمایوندای: تاکی زوئیت‌های تازه و فعال انگل توکسپلاسمایوندای (2×10^4) را به صورت داخل صفاقی به موش سوری تزریق نموده و بعد از گذشت ۴-۵ روز موش‌ها را کشته و با تزریق مقداری PBS استریل حاوی استرپتومایسین-پنی‌سیلین به داخل صفاق، انگل تکثیر یافته را به داخل سرنگ می‌کشیم.^(۱۴، ۱۵)

طراحی پرایمره: براساس توالی استاندارد ژن کدکننده آنتی ژن کامل GRA5 با شماره دستیابی EU918733.1 Forward: (aagcttatggcgctgtaaaacgcg) Reverse: (gaattcttacttcctcggcaacttc) پرایمر Forward دارای جایگاه برش آنزیمی Hind3 و کدون شروع(ATG) و پرایمر Reverse دارای جایگاه برش آنزیمی EcoRI و کدون توقف(TAA) است. قطعه تکثیر یافته توسط پرایمرهای فوق حدود ۳۶۳ bp می باشد. تکثیر ژن GRA5 با روش PCR برای انجام این مرحله DNA استخراج شده از تاکی زوئیت های توکسپلاسمای گوندای به عنوان الگو استفاده گردید و واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. ترکیبات و برنامه استفاده شده در جدول های زیر آمده است.

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 5×10^7) از سلول های جدا شده در بافر PBS را درون یک ویال ۲۰ μL ریخته و ۲۰۰ میکرولیتر از بافر TL و ۱/۵CC میکرولیتر از پروتئیناز K موجود در کیت را به آن اضافه کرده و به مدت ۱ ساعت در ۶۰ درجه سانتیگراد انکوبه می شود. 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 ۱۰۰ را به یک تیوب ۱/۵ 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.

نوع ماده	مقدار بر حسب میکرولیتر (μl)
mamix ster	12 μl
Primer forward	(10 pmol / μl) 1 μl
Primer reverse	(10 pmol / μl) 1 μl
Template DNA	3 μl
ddH ₂ O	18 μl

مرحله	درجة 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

مورد نظر، که در جدول زیر آمده، در یک میکروتیوب ۰/۵ میکرولیتری، به طور شبانه در دمای ۲۲°C انکوبه شد و محصول واکنش اتصال تا مرحله بعد در -۲۰°C نگهداری گردید.

کلونینگ ژن GRA5 در پلاسمید pTZ57R با استفاده از کیت کلونینگ (#k1213) T/A(Cloning Kit) شرکت Fermentas و دستورالعمل آن، ژن GRA5 در پلاسمید pTZ57R در کلون گردید. به طور خلاصه پس از ریخته شدن مواد

مقدار	ماده
1μ6	ligation buffer 10X
1μ1	T4DNA ligase
1μ3	pTZ57R/T
1μ10	PCR Production
1μ10	ddH2o

این محیط کشت، کلنج های فاقد پلاسمید نوترکیب به رنگ آبی و کلنج های حاوی پلاسمید نوترکیب به رنگ سفید خواهند بود.(۲۲،۱۷)

روش های تأیید کلونینگ:

مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلنج های آبی و سفید: پلاسمیدهای موجود در کلنج های سفید(به علت وجود قطعه کلون شده در آن) سنگین تر از پلاسمیدهای موجود در کلنج های آبی هستند.(۱۶). برای این منظور پلاسمیدهای استخراج شده از پلاسمید کلنج 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 ۲-۴ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و ۳ میکرولیتر پلاسمید استخراج شده از کلنج 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 توكسوپلاسمای گوندای در بانک ژنی مقایسه شد و در bankit با شماره دستیابی JF501522 ثبت گردید.

ساب کلون 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

انتقال پلاسمید کلون شده به باکتری مستعد (Transformation) OP10 میکرولیتر سلول مستعد نگهداری شده در ۱۰۰°C-۷۰°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 ۹۰ گذاشته شد. در مرحله بعد مخلوط فوق را به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲°C شوک حرارتی داده و بلافالسله به مدت ۳-۲ 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°C قرار دادیم. حدود ۳۰۰ میکرولیتر از مایع را دور ریخته و مابقی درون میکروتیوب 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-ایندولیل-D-β-گالاکتوپیرانوزید) و IPTG به روش زیر کشت داده شدند. در زیر هود و شرایط استریل، مقدار ۱۰۰-۲۰۰ میکرولیتر از محصول بالا(سلول های ترانسفورم شده) به یک پلیت حاوی آنتی بیوتیک، IPTG و X-Gal اضافه و به کمک میله شیشه ای در تمام نقاط پلیت پخش گردید. پلیت ها به طور شبانه(۱۶-۱۸ ساعت) در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. سپس به مدت چندین ساعت در دمای ۴°C قرار داده شد تا کلنج های آبی(کلنج فاقد پلاسمید نوترکیب) یا سفید(کلنج حاوی پلاسمید نوترکیب) ظاهر شوند. در

حاوی پلاسمید قادر به رشد بر روی محیط کشت
حاوی آمپی سیلین می باشند.(۱۶)

روش های تأیید کننده کلون شدن قطعه *GRA5* در پلاسمید بیانی *pcDNA3*

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

بر روی *PCR* ژن *GRA5* با استفاده از پلاسمید نوترکیب *pcGRA5* به عنوان الگو: واکنش *PCR* به حجم ۲۵ میکرولیتر مطابق با شرایط مذکور در قسمت ۲-۴ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و پلاسمید *pcGRA5*،
که با خال دنдан استریل برداشت شد، به عنوان الگو انجام گردید.

برش پلاسمید نوترکیب *pcGRA5* با آنزیم های *EcoRI* و *indH3*: برش آنزیمی شامل ۲۵ میکرولیتر پلاسمید نوترکیب *pcGRA5*، ۱ میکرولیتر آنزیم *EcoRI* ۱ میکرولیتر آنزیم *indH3*، ۸ میکرولیتر بافر تانگو و ۵ میکرولیتر آب مقطّر 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، بهزاده هر ۱۰۰ میلی لیتر محیط *DMEM*، مقدار ۵-۱۰ 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* استفاده شد. طبق دستور شرکت سازنده روش استفاده از کیت ترانسفکت به این ترتیب است: یک روز قبل از ترانسفکت، تعداد 1×10^6 سلول یوکاریوت در هر چاهک ۳۵ میلی متری از پلیت شش خانه ای کشت داده شد و به طور شبانه در ۳۷°C

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 *pTGRAS* ۱ میکرولیتر آنزیم *EcoRI* ۸ میکرولیتر آنزیم *Hind3*، میکرولیتر بافر تانگو و ۵ میکرولیتر آب مقطّر تهیه و پس از ورتكس و spin، مخلوط فوق به طور شبانه در بن ماری 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 مقطّر تهیه و برای یک ساعت در ترموسیکلر ۲۲°C و بعد به طور شبانه در یخچال نگهداری شد.

انتقال پلاسمیدهای کلون شده داخل ناقل *pcGRA5*: 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 سانت ریفوژ 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(آمپی سیلین) اضافه کرده و با میله شیشه ای روی محیط جامد پخش و به طور شبانه در ۳۷°C انکوبه نمودیم. تنهایی های باکتری های

بار از سمپلر گذرانده تا سلول ها جدا شوند و سپس محتويات هر چاهک در یک میکروتیوب ۱/۵CC جمع آوری گردید. سلول های مذکور تا زمان استفاده در ۲۰°C - نگه داری شد.

تاييد بيان ژن GRA5 در سلول یوکاريوتيك: برای تاييد بيان ژن در محیط کشت سلولی از چند روش استفاده می شود که مهم ترين آن ها روش وسترن بلاط است. در اين روش باندهای پروتئينی که در روی ژل آکريل آميد الکتروفورز شده‌اند به يك غشاء(مانند نيتروسلولز)، که قابلیت اتصال و ثبیت پروتئین را داشته، منتقل می شوند. در اين روش ملکول های پروتئین از ژل خارج شده و در سطح غشاء در همان موقعیت قرار می گيرند. برای تشخیص پروتئین های منتقل شده به غشاء باید از لیگاندهای اختصاصی یا سوبستراتی مربوطه استفاده شود. آنتی بادی ها از متداول ترين موادی هستند که در تشخیص اختصاصی پروتئین ها در غشاء به کار می روند.(۱۸،۱۹)

يافته 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 توكسپلاسم گوندای است. بنابراین، پرايمرهای طراحی شده برای تکثیر اين ژن اختصاصی بودند.(شکل ۱)

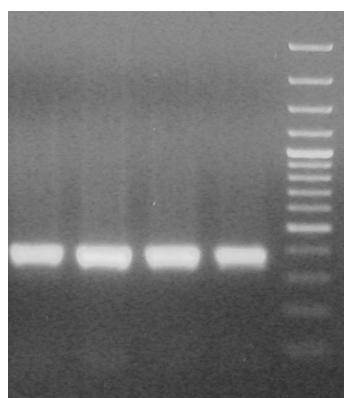
درصد CO₂ انکوبه گردید. قبل از ترانسفکت می بايست سلول ها ۵۰-۸۰ درصد از پلیت را پر کرده باشنند.

۱- برای ترانسفکت هر چاهک مقدار ۹۷ میکرولیتر محیط FCS فاقد DMEM درون یک ویال استریل ریخته و ۳ میکرولیتر معرف Fugene به آن اضافه شد و پس از آن ۱ ثانیه ورتكس و به مدت ۱۵-۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. نسبت مورد استفاده برای ترانسفکت ۱:۳ 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 یوکاريوتيك را توسط پیپت تخلیه نموده و ۱ میلی لیتر محیط کشت (FCS)DMEM به چاهک اضافه و سپس محتويات 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 ۲۴-۷۲ ساعت انکوبه گردید.

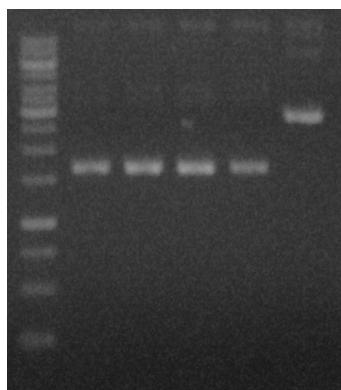
۴- پس از طی اين مدت، سلول های ترانسفکت شده و سلول های ترانسفکت نشده در شرایط کاملاً استریل جمع آوری گردید. برای اين منظور، ابتدا سلول ها با PBS شستشو شده و با اضافه کردن ۴۰۰ میکرولیتر PBS به هر چاهک، با نوک سمپلر سلول ها را از کف پلیت جدا کردیم. محتويات هر چاهک را چند



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

پلاسمیدهای استخراج شده از کلونی های سفید به دلیل سنگینی در ژل آگاروز مقداری بالاتر از کلونی های آبی قرار گرفتند.(شکل ۲)

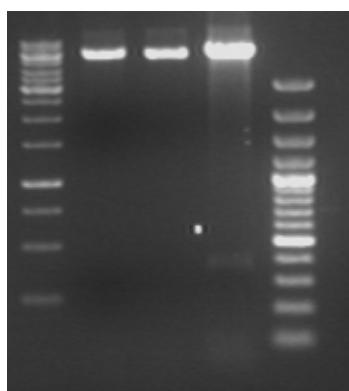
۳-۲. مقایسه پلاسمیدهای استخراج شده از کلنی های سفید و آبی : کلنی های سفید و آبی روی محیط LB مایع حاوی آمپیسیلین و آغشته به X-gal و IPTG نشان دهنده ترانسفورماسیون موفق است.



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

pTZ57R بود. بنابراین، نتایج برش آنزیمی روی ژل آگاروز، کلون ژن GRA5 درون پلاسمید pTZ57R را تایید می نماید.(شکل ۳)

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



شکل شماره ۳. نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pTGRA5 روی ژل آگاروز ۱/۷ درصد، ستون ۱ مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، ستون ۳ مونو دایجست پلاسمید pcGRA5 ستون ۲ پلاسمید pcGRA5 آنزیم خوردگ و ستون ۵ مربوط به مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی

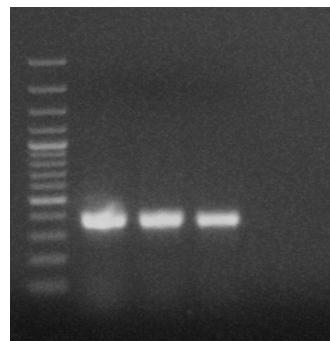
توالی ژن GRA5 کلون شده توکسوپلاسما گوندای در این مطالعه در بانک ژنی با شماره دستیابی JF501522 ثبت شد.

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

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

باکتری های ترانسفورم شده روی ژل آگاروز باندی را نشان دادند که تأییدکننده کلون قطعه GRA5 در پلاسمید pcDNA3 بود.(شکل ۴)

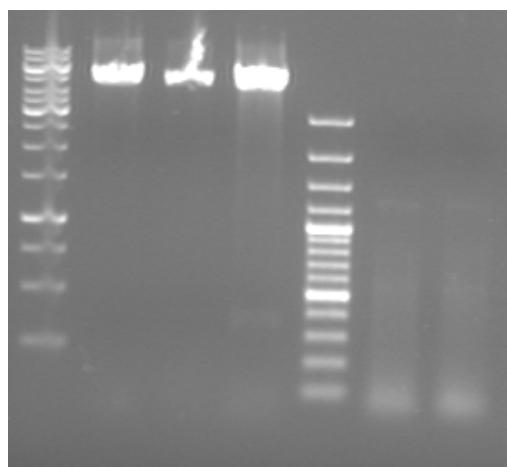
محیط LB حاوی آنتی بیوتیک آمپریک سیلین، نشان دهنده ترانسفورماسیون موفق پلاسمید در باکتری مستعد بود. پلاسمید pcGRA5 استخراج شده از



شکل شماره ۴. نتایج الکتروفورز باند pcGRA5 روی ژل آگاروز ۱ درصد ستون ۱، ۲ و ۳

بود و باند دیگر حدود ۳۶۳ bp که برابر با قطعه GRA5 است. بدین ترتیب ساپ کلون قطعه GRA5 درون pcDNA3 نیز تأیید گردید.(شکل ۵)

نتایج برش آنزیمی پلاسمید نوترکیب pcGRA5: نتایج برش آنزیمی pcGRA5 با آنزیم های EcoRI و Hind3 دو باند را نشان داد که یکی حدود ۵۴۰۰ bp



شکل شماره ۵: ستون ۱ و ۲ مربوط به مونو دایجست pcDNA3 و ستون ۳ لادر ۱۰۰۰ جفت بازی و ستون های ۴ و ۵ مربوط به دابل دایجست pcDNA3 و ستون ۷ لادر ۱۰۰ جفت بازی

بحث و نتیجه گیری

توكسوپلاسموز نوعی بیماری زئونوزاست و داشتن واکسنسی مؤثر می تواند اثرات مفیدی 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 مزمун که نیاز به مراقبت

نتایج وسترن بلاط: به دنبال انجام SDS-PAGE با انجام تست وسترن بلاط کاغذ رنگ گرفته نیتروسلولز باندهای قهوه ای 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.

عمر می باشد،(۲۱). واکسن DNA کوکتل در مقدار کم باعث تحریک پاسخ های ایمنی همورال و سلولی می شود 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 توکسوبلاسما گوندای) می باشد. بر همین اساس، شناسائی ژن های انگل از اهمیتی خاص برخودار است. با توجه به آنالیز تعیین توالی ژن GRA5 توکسوبلاسما 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 توکسوبلاسما 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 توکسوبلاسما گوندای می باشد. در برش آنژیمی قطعه ۳۶۳ bp جدا شد که هم اندازه ژن GRA5 توکسوبلاسما گوندای بوده و در حقیقت ساب کلون این ژن را در پلاسمید pcDNA3 pTGRA5 نتایج حاصل از PCR پلاسمید 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 بلاست بیان پروتئین ۱۳ کیلو دالتونی تایید شد. بنابراین، می توان با استفاده از پلاسمیدهای نوترکیب برای تهیه واکسن علیه بیماری های انگلی در آینده امیدوار بود.

در مجموع، در این پژوهش ژن GRA5 توکسوبلاسما 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.

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

برای مدت ۵۰ سال، آنتی ژن های خام به عنوان واکسن علیه توکسوبلاسموز مورد آزمایش قرار گرفته اند که مطالعات بر روی کارایی زیر واحدهای خالص یا ترکیبی جدید حدود ۱۰ تا ۲۰ سال سابقه دارد. واکسن های زیر واحدهای خالص دارای این مزیتند که حاوی آنتی ژن های ایمنیزیک 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 ادجتونت ها باعث ارتقای کارایی واکسن می شوند. در حال حاضر، تکنولوژی پیشرفتہ واکسیناسیون DNA آینده خوبی را برای توسعه و ایجاد واکسن های چند ظرفیتی پیشنهاد می کند، به طوری که این واکسن ها پاسخ های ایمنی همورال و سلولی پایدار و قوی ای را ایجاد می کنند،(۲۰). یکی از راه های مهم دست یابی به واکسن های چند ظرفیتی در مبارزه با توکسوبلاسموزیس استفاده از واکسن های DNA کوکتل می باشد که باعث ایجاد پاسخ های ایمنی-محافظتی طولانی مدت و مؤثر می شوند،(۲۱). به علت این که انگل های داخل سلولی نظیر توکسوبلاسما گوندای تعداد زیادی از اپسی توب های آنتی ژنیک را عرضه کرده و توانایی آن ها در عرضه آنتی ژن در میان افراد مختلف، بسیار متعدد می باشد، ایمنیزاسیون با واکسنسی که پاسخ ایمنی را در مقابل طیف وسیعی از آنتی ژن ها تحریک کند بسیار مؤثرتر از واکسنسی می باشد که فقط از یک آنتی ژن تشکیل شده و پاسخ ایمنی را بر ضد این آنتی ژن تحریک می نماید،(۲۱). از مزیت های دیگر واکسن DNA کوکتل این است که باعث تولید مقدار زیادی ایترفرون گاما شده و هم چنین باعث القای تولید آنتی بادی می گردد. این واکسن ها عمدهاً باعث تولید سایتوکین های Th1 می شوند 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

پیرستانی و سروی و هم چنین کارکنان محترم گروه
انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس ابراز دارند.

نویسندها این مقاله بر خود واجب می دانند مراتب تقدیر و
تشکر خود را از جناب آقای دکتر صدرایی، آقایان

References

- 1-Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzikto 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-Soljhous K. Preparation and evaluation of DIG-ELISA for serodiagnosis of toxoplasmosis. Thesis for MSc. Tarbiat Modares University, October 2000. (Persian)

- 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)



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

Naserifar R¹, Ghaffarifar F^{1*}, Dalimi Asl A¹, Sharifi Z²

(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, GRA5 was 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 gondii, 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)